

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRAIRE DE LYON

Année 1965 — N° 18

LES
SUBSTANCES ADJUVANTES
ET
STIMULANTES de L'IMMUNITÉ
Application à l'Étude
d'une Huile Intérestérifiée

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 14 Mai 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRAIRE
(Doctorat d'État)

PAR

Monsieur FASSI-FEHRI Mohamed

Né le 27 Mai 1937 à FEZ (Maroc)



Imprimerie Maurice FABRE
14, Rue de la Favorite
LYON

1965

*LES SUBSTANCES ADJUVANTES
ET STIMULANTES DE L'IMMUNITÉ
APPLICATION A L'ÉTUDE
D'UNE HUILE INTÉRESTÉRIFIÉE*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

LES
SUBSTANCES ADJUVANTES
ET
STIMULANTES de L'IMMUNITÉ
Application à l'Étude
d'une Huile Intérestérifiée

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

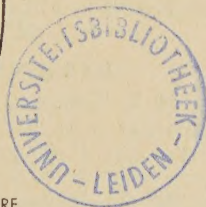
et soutenue publiquement le 14 Mai 1965

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
(Doctorat d'État)

PAR

Monsieur FASSI-FEHRI Mohamed

Né le 27 Mai 1937 à FEZ (Maroc)



Imprimerie Maurice FABRE
14, Rue de la Favorite
LYON

1965

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur	M. FLORIO
Directeur honoraire	M. JUNG
Directeur honoraire	M. TAPERNOUX
Professeur honoraire	M. CUNY

14 Chaires.

PROFESSEURS

1 ^{re} Pharmacie et Toxicologie.....	MM. TAPERNOUX
2 ^e Anatomie descriptive, Extérieur, Anatomie appliquée.....	BARONE
3 ^e Physiologie, Thérapeutique, Pharmacodynamie	BOST
4 ^e Histologie, Embryologie, Anatomie pathologique.....	LUCAM
5 ^e Hygiène et Industrie des Aliments d'origine animale.....	FLACHAT
6 ^e Zoologie appliquée, Parasitologie externe, Parasitologie interne.....	EUZEBY
7 ^e Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores. Législation vétérinaire	FLORIO
8 ^e Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour	COTTEREAU
9 ^e Technique chirurgicale, Pathologie chirurgicale	COLLET
10 ^e Obstétrique, Pathologie de la Reproduction	BERTRAND
11 ^e Microbiologie, Immunologie, Maladies contagieuses, Police sanitaire.....	JOUBERT
12 ^e Ethnologie, Hygiène, Zootechnie, Economie rurale	FROGET
13 ^e Botanique appliquée, Agronomie, Alimentation.....	JEAN-BLAIN
14 ^e Physique et Chimie biologiques et médicales.	MAGAT

MAÎTRES DE CONFÉRENCE, non Chefs de service.

MM. FERNEY, RUCKEBUSCH, Agrégés.

CHEFS DE TRAVAUX

MM. BUSSIÉRAS, OUDAR, Agrégés.
CHANTEGRELET, JEAN-BLAIN Claude, LAPRAS,
LE NIHOUANEN, VAN HAVERBEKE.

ASSISTANTS

M. DESCHANEL, M^{lles} DUFOUR, GENTILLETI, GONZALÈS,
MM. PROY, VERINE.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Président : M. le Professeur MONNET, de la Faculté de Médecine de Lyon

Premier Assesseur : M. le Professeur JOUBERT, de l'École Vétérinaire

Deuxième Assesseur : M. le Professeur EUZEBY, de l'École Vétérinaire

La Faculté de Médecine et l'École Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.

A MA MERE, A MON PERE

A qui je dois tout ; hommage d'amour
filial et de reconnaissance.

A MES SŒURS, A MES FRERES

A CEUX QUI ME SONT CHERS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MONNET

*Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Lyon*

Qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de notre Jury
de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de
notre respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. JOUBERT

de l'Ecole Vétérinaire de Lyon

Qui nous prodigua le fruit de son expérience et nous accueillit dans son laboratoire ; qu'il veuille bien accepter l'humble témoignage de notre grande estime ; après ce modeste travail, qui n'est qu'une étape, qu'il ne cesse jamais de nous considérer comme un disciple.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. EUZEBY

de l'Ecole Vétérinaire de Lyon

Qui a bien voulu s'intéresser à cette modeste contribution, nous le remercions d'avoir accepté de juger notre travail.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. FLORIO

Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire

Qui a rendu possible la réalisation de
ce travail en nous acceptant comme
Assistant dans son Ecole.

Hommage respectueux et reconnaissant.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. THIBAUT

de l'Institut Pasteur de Paris

Qui nous a enseigné le goût de la
minutie et le souci de la précision ;
humble témoignage de notre profonde
gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. OUDAR

de l'Ecole Vétérinaire de Lyon

En témoignage de l'aide qu'il a bien
voulu nous donner.

Sincères remerciements.

A TOUS NOS MAITRES
DE L'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

A TOUS NOS MAITRES
DE L'INSTITUT PASTEUR

A TOUS NOS CAMARADES D'ETUDES

A TOUS CEUX QUI NOUS ONT PROCURE LEUR AIDE
POUR L'ELABORATION DE CE TRAVAIL

Les Substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité

Application à l'étude d'une huile intérestérifiée

AVANT-PROPOS

Poursuivant une étude sur les propriétés adjuvantes et stimulantes de l'immunité d'une huile de noyaux inter-estérifiée, Monsieur le Professeur JOUBERT décida de nous associer à ce travail.

Nous fûmes entouré, dans le laboratoire de microbiologie où naquit ce travail, de toute la sollicitude qu'il soit possible de rencontrer.

Nous témoignons notre profonde gratitude à notre Maître, Monsieur le Professeur JOUBERT, qui nous guida toujours avec sagesse et dynamisme dans la réalisation de ce travail, et dont la bonté ne cessa jamais de se manifester à notre égard.

Nous sommes heureux d'exprimer tous nos remerciements à Monsieur le Professeur OUDAR, qui fut pour nous un excellent conseiller, guidant nos premiers pas en bactériologie.

Nous exprimons également notre gratitude à tous ceux qui nous ont permis de réaliser ce travail :

— à Messieurs GATTEFOSSÉ et MAHLER, qui nous ont fourni l'excipient et de nombreuses précisions techniques ;

— à Monsieur TOMMASI, qui nous a aidé à faire l'étude histologique des prélèvements et à réaliser les microphotographies ;

— à Messieurs PARAF, CARRAZ et VALETTE, qui nous ont aimablement éclairé de leurs conseils et nous ont fourni de nombreuses références bibliographiques.

INTRODUCTION

« Non, mille fois non, il n'existe pas une catégorie de sciences auxquelles on puisse donner le nom de sciences appliquées. Il y a la science et les applications de la science, liées entre elles comme le fruit à l'arbre qui l'a porté. »

L. PASTEUR.

C'est en hommage à la célèbre découverte de JENNER, qui a permis la protection de l'homme contre la variole par le virus de la vaccine bovine, que le terme de vaccination a été créé. La vaccination consiste à introduire dans l'organisme une substance appelée antigène, sous forme de préparation — vaccin — qui possède la faculté de solliciter l'élaboration de substances — les anticorps et l'interféron — susceptibles de le protéger ultérieurement contre l'agression des microbes ou des toxines correspondantes.

Les vaccins sont classés en deux catégories suivant l'état biologique de l'antigène. On distingue :

1° Les virus-vaccins vivants atténués : l'atténuation se fait par des moyens physiques, chimiques ou biologiques. On peut citer comme exemple, les vaccins préparés par

PASTEUR contre le choléra des poules, le charbon bactérien, le rouget du porc et la rage. C'est ce même principe qui sert à la préparation du B.C.G. et de nombreux vaccins vétérinaires. En matière de virus, ce sont des vaccins interférants.

2° Les vaccins chimiques inactivés : des procédés semblables sont utilisés pour inactiver les germes ou leurs toxines. Le vaccin antirabique de FERMI, le vaccin anti-aphteux de SCHMIDT-WALDMAN-VALLÉE et de nombreux autres sont couramment utilisés. En particulier, les vaccins préparés à partir des toxines sous l'action combinée et ménagée de la chaleur, du formol et du vieillissement perdent irréversiblement leur toxicité tout en conservant leur pouvoir immunogénique et flocculant : ce sont les anatoxines. C'est ainsi que la vaccination antidiphthérique, antitétanique et antibotulinique a pu être réalisée. Par extension, on dénomme « anavaccins » formolés, phéniqués, chloroformés... les vaccins inactivés par la chaleur et un ou plusieurs antiseptiques.

Mais, tous ces vaccins, qu'ils soient atténués ou inactivés, déterminent une protection souvent insuffisante ou de courte durée ; certains sujets s'immunisent mal ; la diversité des souches d'un même virus comme le virus aphteux, le virus grippal, le virus poliomyélitique et bien d'autres, rendent la vaccination aléatoire ; parfois, le pouvoir immunogène et le pouvoir allergène d'une souche bactérienne sont parallèles ; ces souches, utilisées pour la préparation des vaccins, entraînent des accidents post-vaccinaux graves. C'est pour lutter contre un ou plusieurs de ces inconvénients que les immunologistes ont été amenés à introduire dans leurs vaccins des substances dites « adjuvantes et stimulantes de l'immunité » (70).

Nous envisagerons dans une première partie quelques généralités sur les adjuvants de l'immunité, leur définition, leur historique et leur importance. Nous en donnerons ensuite une classification. Un rappel sur la réponse immunitaire nous permettra d'aborder les moyens d'étude des

adjuvants et d'essayer d'élucider leur mécanisme d'action. Nous relaterons, enfin, quelques-unes de leurs applications.

Une deuxième partie, réservée à l'étude du pouvoir adjuvant d'un glycéride interestérifié, comprendra un bilan de ses propriétés toxicologiques et pharmacodynamiques, en soulignant celles qui nous ont amené à étudier son pouvoir adjuvant de l'immunité, les expériences dont il a fait l'objet au laboratoire de microbiologie, et les conclusions qu'elles permettent d'en tirer.

PREMIERE PARTIE

**ETUDE SYNTHETIQUE DES SUBSTANCES
ADJUVANTES ET STIMULANTES DE L'IMMUNITE**

GENERALITES

I. — DEFINITIONS - COMMENTAIRES

Du latin *adjuvans* — qui aide — le terme d'ADJUVANT, utilisé presque exclusivement dans le langage médical, désigne un médicament auxiliaire qui seconde l'action du principe actif fondamental. Un *adjuvant de l'immunité* est un facteur qui stimule l'immunisation. Ce terme, envisagé dans son sens le plus large, engloberait l'ensemble des facteurs d'immunité non spécifiques propres à l'organisme, ce qu'on appelle l'état du terrain, c'est-à-dire son génome, son âge, sa physiologie et sa pathologie, ainsi que les facteurs extrinsèques de l'immunité qui comprennent l'habitat, la nutrition, les traumatismes, la température, la saison, l'altitude, l'irradiation et les agents chimiques et thérapeutiques. Dans leur sens *restreint*, les adjuvants de l'immunité, tels qu'ils sont définis par RAMON, sont des « *substances qui, injectées en mélange avec l'antigène, favorisent le développement et la production des anticorps par l'organisme* » (71).

Il s'agit de substances diverses, non spécifiques, non antigéniques, que l'on ajoute à l'antigène dans le but d'accroître la production de l'immunité. Elles n'ont aucune action directe sur l'activité proprement dite de l'antigène ni sur les lieux de production des anticorps. Ce sont des substances introduites dans les vaccins pour permettre à l'organisme d'utiliser au mieux l'antigène pour l'établissement et le développement de l'immunité.

LAHIRI remarqua, à la suite de nombreux auteurs, que l'anatoxine diphtérique brute possède un pouvoir immu-

nogène supérieur à l'anatoxine purifiée. DRESSER (19), travaillant avec la gamma-globuline bovine purifiée et non purifiée, constate que la gamma-globuline non purifiée entraîne l'immunité à la dose où la gamma-globuline purifiée détermine un blocage immunitaire. C'est ainsi que la notion d'« adjuvantité » a été introduite en immunologie, en 1961, par DRESSER. Si ce terme est critiquable et peut être remplacé par une périphrase : « pouvoir de stimulation de l'immunogénèse », l'idée qu'il implique est bien différente de la définition initiale de RAMON. Le pouvoir de stimulation de l'immunité serait lié, d'après DRESSER, à tous les antigènes qui peuvent déclencher la production des anticorps en l'absence de tout adjuvant. La présence d'un site antigénique n'est pas suffisante pour induire une synthèse d'anticorps ; il faut qu'en outre cette substance possède un « site adjuvant » différent du site antigénique qui aurait pour rôle de provoquer la réaction de l'organisme et de le rendre apte à répondre à la présence du motif antigénique. Cette conception nous paraît quelque peu abusive ; l'adjuvantité serait alors l'ensemble des propriétés liées au volume et à la masse de la molécule immunogénique. Serait-ce alors un abus de langage ou une notion nouvelle ? Mais, en l'absence d'expériences plus probantes, il est encore préférable de garder la notion plus classique et bien plus solide de l'antigène et de l'haptène établie par LANDSTEINER.

De récentes expériences de vaccination d'animaux avec une anatoxine additionnée soit de sulfate de cobalt, soit de sulfate de cuivre, ou de vitamine B 12, ou de protamine, montrent que ces substances déterminent une élévation d'anticorps très marquée par rapport aux témoins ayant reçu la même anatoxine additionnée d'un adjuvant minéral (alun de potasse) (36). On a donné le nom de *coadjuvant* à ces substances, dont le rôle reste encore mal connu, mais qui pourraient avoir une grande importance dans les phénomènes immunitaires (56).

II. — SYNONYMIE

L'appellation d'adjuvant de l'immunité n'a pas de synonyme ; mais il est nécessaire de la différencier de certains termes pharmacologiques.

— Excipient : c'est une substance à laquelle on incorpore les principes actifs d'un médicament pour les rendre plus absorbables ; la vaseline et la lanoline sont des excipients pour les pommades. Un excipient peut servir d'adjuvant aux antigènes qu'on lui associe.

— Véhicule : c'est un excipient liquide ; une substance dans laquelle on dissout les autres principes actifs du médicament. Un véhicule peut avoir des propriétés adjuvantes de l'immunité.

— Substrat : d'une manière générale, ce sont des corps avec lesquels le principe actif s'unit d'une manière spécifique ; par exemple, on peut citer les substrats d'enzymes qui n'ont point de parenté avec les adjuvants.

— Support : en chromatographie, c'est souvent une colonne d'alumine qui sert à l'analyse d'un mélange déterminé ; c'est aussi un papier spécial, dit « Watman », qui joue le même rôle. On parle aussi de support pour la lyophilisation. Dans le vaccin anticlaveleux de DELPY, dans le vaccin anti-aphteux, le gel d'alumine joue le double rôle de support¹ de virus, d'adjuvant de l'immunité, voire de complexe d'adsorption. La saponine jouerait un rôle dans la constitution de gluco-complexes (ESPINET).

III. — IMPORTANCE

L'étude des adjuvants de l'immunité s'est révélée très fructueuse aussi bien du point de vue théorique et doctrinal que du point de vue pratique.

A) *Quelques aspects de leur intérêt théorique.*

Les travaux réalisés avec les adjuvants de l'immunité

ont permis d'apporter quelques explications sur la spécificité des anticorps, sur leur structure et sur le mécanisme de leur biosynthèse.

La nature exacte de la structure du site déterminant peut être étudiée soit :

— par les « antigènes artificiels » : antigènes modifiés par des radicaux divers ;

— par dénaturation progressive de l'antigène.

L'immunisation des lapins par ces antigènes nécessite le plus souvent des adjuvants (alun de potassium : CARSTEN et EISEN, adjuvant de Freund : DIXON et MAURER) (18).

La structure 19 S et 7 S des globulines, leur demi-durée de vie, leur avidité ne sont pas les mêmes lors d'une réponse secondaire. L'utilisation des adjuvants de l'immunité permet d'aborder tous ces problèmes.

Mais ce sont les problèmes d'immunopathologie, de l'homogreffé, de la tolérance immunitaire et de l'allotypie qui ont suscité le plus l'intérêt expérimental des adjuvants de l'immunité.

Ils ont aussi permis de démontrer le pouvoir antigénique de substances que l'on considérerait jusque-là comme incapables de provoquer la formation d'anticorps spécifiques comme la gélatine (MAURER), l'hémoglobine, l'insuline...

B) *Quelques aspects de leur intérêt pratique.*

L'adjonction de substances adjuvantes à un vaccin entraîne une exaltation immédiate de l'immunogénèse et une prolongation de l'état d'immunité.

- 1) *La stimulation précoce de l'immunogénèse* se traduit par une plus grande résistance des animaux à l'injection d'épreuve et dans des délais relativement plus courts par rapport à une immunisation avec le même antigène sans adjuvant. Ainsi, dans la vaccination du veau contre la peste bovine avec un anti-

gène formolé adsorbé sur gel d'alumine, la protection est totale au bout de 6 à 12 jours selon les individus. Dans la maladie de Newcastle, JACOTOT injecte à un premier groupe de 4 poules une suspension brute d'ovovirus formolé et à un deuxième groupe une suspension brute d'ovovirus formolé additionné de Mayoline et d'Arlacel dans des proportions convenablement choisies. Les sujets ayant reçu l'antigène seul ont succombé en 4, 5 ou 6 jours à l'épreuve virulente faite 15 jours après l'injection de rappel. Ceux qui ont reçu l'antigène avec l'adjuvant ont résisté à cette épreuve.

- 2) *La prolongation de l'état d'immunité* se traduit par une résistance des animaux vaccinés aux inoculations d'épreuve bien au-delà des délais de protection réalisés par un antigène sans adjuvant.

L'immuno-stimulation précoce caractérise tous les adjuvants, mais « l'effet retard » ne s'observe que pour certains et en particulier pour les adjuvants huileux (39).

- 3) L'usage d'un adjuvant donne, dans certains cas, la possibilité de *réduire le nombre des injections* sans que la qualité de l'immunité ne s'en trouve affectée. Ceci est particulièrement appréciable aussi bien pour la vaccination des petits animaux (volaille, vison...) que pour la vaccination du gros bétail dans les régions d'élevage extensif et pour la prophylaxie médicale généralisée annuelle (fièvre aphteuse).
- 4) Il existe, enfin, des adjuvants qui favorisent la *conservation des vaccins* auxquels on les associe. C'est ce qu'on observe par exemple avec l'antigène formolé de Newcastle additionné d'huile minérale ; les mêmes résultats sont obtenus avec du gel d'alumine incorporé à l'anavirus formolé contre la peste bovine.

IV. — HISTORIQUE

Première étape : Les précurseurs :

ROUX et YERSIN (77), en 1889, réalisèrent l'adsorption de la toxine diphtérique sur des sels d'aluminium et de calcium. En 1901, Maurice NICOLLE écrivait dans son « *Elément de Microbiologie* » que « ces adsorbats se comportent tout autrement que la toxine libre. La toxine adsorbée perd de son pouvoir toxique ».

Th. SMITH constate que, d'après J. BORDET (8), vers 1909, l'on confère aux cobayes une résistance accrue lorsqu'on leur injecte des mélanges toxine-anatoxines ; cette immunité dure encore plus longtemps lorsque l'injection entraîne une réaction locale.

H. VALLÉE (90), au cours de ses recherches sur les vaccins irrésorbables, essayait de créer une lésion locale aussi permanente que possible en utilisant des débris cellulaires et des particules de grès. Cette lésion provoque, chez l'animal ainsi vacciné, l'apparition d'une résistance très marquée. Son but était donc d'obtenir une résorption lente de l'antigène. Des constatations analogues ont été faites par GLENNY et SUDMERSEN, en 1921.

Deuxième étape : G. RAMON et ses travaux fondamentaux. Ses continuateurs.

Procédant à l'examen attentif des animaux producteurs de sérum, G. RAMON remarqua que ceux dont le sérum était riche en antitoxine étaient porteurs au lieu de l'injection de l'antigène de réaction inflammatoire évoluant souvent vers l'abcédation. Il essaya de réaliser expérimentalement des réactions inflammatoires en utilisant des substances qu'il qualifia « d'adjuvantes et stimulantes de l'immunité ». Il conclut, en ce qui concerne la vaccination antitoxique, que « c'est le tapioca qui nous parut remplir le mieux l'ensemble des conditions que nous recherchions ». Il n'était donc

nullement question d'appliquer ce procédé à l'homme en raison des réactions parfois trop vives qu'il détermine. C'est alors qu'il eut l'idée de remplacer les substances non antigéniques par des suspensions de bactéries figurées de même rôle : il réalisa, en collaboration avec ZOELLER, la vaccination associée (71).

Après 1925, signalons les travaux de G. RAMON et Coll. sur les huiles, la lanoline, le cholestérol, de S. SCHMIDT sur l'hydroxyde d'aluminium, le chlorure de calcium, de MYER sur l'huile de vaseline additionnée de gomme d'acacia, de JACOTOT sur le latex, de SALK sur les huiles minérales.

Troisième étape : L'adjuvant de FREUND et les recherches d'immunologie quantitative théorique.

En 1937, FREUND, travaillant sur la sensibilité du cobaye à la tuberculine, remarqua que le sérum des animaux qui avaient reçu une injection de mycobactéries tuées en émulsion dans la paraffine, présentait de grandes quantités d'anticorps antimycobactériens. Cette émulsion reçut le nom d'adjuvant de Freund et devint un moyen précieux pour les investigations ultérieures en immunologie (27, 28).

L'adjuvant de Freund a la double propriété d'augmenter et de prolonger la formation des anticorps sériques d'une part, et d'entraîner un état d'hypersensibilité de type retardée vis-à-vis de l'antigène d'autre part. C'est un élément qui a favorisé une nouvelle orientation de l'esprit vers une interprétation quantitative des phénomènes immunitaires. Toutes les conditions des réactions mesurables sont modifiables par l'adjuvant de Freund : le temps, la dose d'antigène (la dose limite supérieure et inférieure, la dose optimale), la quantité d'anticorps à un moment donné, le nombre de cellules compétentes (non encore actuellement déterminé, mais on peut en fixer un ordre de grandeur). L'étude quantitative a pour but de fournir des arguments cinétiques des conditions d'immunisation ; elle permet d'envisager la situation immunologique d'un organisme sous l'aspect dynamique. Mais l'antigène avec

l'adjuvant de Freund persiste longtemps, pendant tout le temps de la réaction immunitaire. Cette réaction immunitaire a des chances de passer par des stades successifs et intriqués. Ces différents états peuvent aussi coexister et se superposer en proportions variables chez le même animal.

La découverte de RAMON s'est révélée bien féconde au fil des années, bien que dans une récente mise au point sur les adjuvants de l'immunité, S.-H. STONES écrit : « le nom de FREUND est presque synonyme de la conception immunologique ». STONES semble ignorer les travaux fondamentaux sur les adjuvants de l'immunité faits bien avant la publication de FREUND. Si les travaux de FREUND sont importants, il n'en reste pas moins que G. RAMON, père des anatoxines, doit être sans conteste crédité également de la paternité des adjuvants de l'immunité dont l'emploi, toujours selon STONES, « a permis d'innombrables recherches immunologiques » et « l'essor de la science immunologique ».

INVENTAIRE ET CLASSIFICATION

Les substances susceptibles de stimuler l'immunité sont très nombreuses ; leur activité dépend essentiellement de la nature de l'antigène et de son état physique. Nous nous proposons d'en donner une classification basée sur les caractères physico-chimiques et physio-pathologiques de l'adjuvant. On peut distinguer quatre groupes :

I) Les adjuvants minéraux

Ce sont les plus employés dans la préparation des vaccins et les seuls dont on puisse recommander l'usage chez l'homme. Ils semblent agir essentiellement en prolongeant l'effet de la stimulation antigénique, en ralentissant l'élimination de l'antigène et en provoquant au lieu de l'injection un granulome qui devient, d'après Coons, un foyer supplémentaire de formation des anticorps (16). Ils sont utilisés :

- soit en solution :
 - chlorure de calcium ;
 - alun de potassium et différents autres aluns ;
- soit en suspension :
 - kaolin ;
 - silice ;
- soit en gel :
 - hydroxyde d'aluminium ;
- soit en émulsion :
 - huiles minérales.

II) Les adjuvants organiques

Certains ont été utilisés à titre expérimental, la plupart entrent dans la préparation de vaccins vétérinaires. Leur activité est en général plus intense que celle des adjuvants

minéraux. Nous distinguons les adjuvants organiques aqueux et les adjuvants organiques huileux :

— les adjuvants aqueux comprennent :

- le charbon,
- le cholestérol,
- l'atoxyl,
- les sels de quinine,
- la glycérine,
- le tanin,
- la digitaline,
- la colchicine,
- la saponine,
- la gélose et l'agar-agar,
- le latex d'Hévéa brasiliensis,
- l'empois d'amidon ,
- le tapioca (amidon de manioc) ;

— les adjuvants huileux :

- les huiles naturelles, les huiles végétales, l'huile de foie de morue, l'huile de noix...,
- les graisses diverses (suif, saindoux...),
- la lanoline,
- la lécithine,
- les hydrocarbures : la vaseline, l'huile de paraffine, les huiles synthétiques (Arlacel, Mayoline... sont utilisées en émulsion).

III) L'adjuvant de FREUND

L'adjuvant incomplet de FREUND est constitué par un mélange de produits dispersifs : mono-oléate de mannitol additionné d'huile de paraffine. L'adjuvant complet de FREUND contient en plus des mycobactéries tuées. La substance élaborée par les mycobactéries et active dans l'effet adjuvant serait représentée par les cires D (RAFFEL, WHITE). L'adjuvant complet de FREUND ne peut être utilisé chez l'homme. Toutefois, LOVELESS, en 1957, a préconisé

l'emploi de mélanges huileux simples sans mycobactéries pour renforcer l'action de certains antigènes. L'adjuvant de FREUND est utilisé expérimentalement pour obtenir chez tous les animaux un taux élevé d'anticorps précipitants, après une injection, parfois deux injections. Il augmente aussi d'une façon considérable la réaction de type hypersensibilité retardée (28).

IV) Les substances figurées et les endotoxines

C'est au cours de ses travaux sur les adjuvants de l'immunité que G. RAMON a émis le principe des vaccinations associées. Il réalisa avec ZOELLER la vaccination de sujets humains adultes, les uns avec de l'anatoxine seule, les autres avec de l'anatoxine additionnée de vaccin antityphoparatyphoïdique (T.A.B.). Il constata que chez ces derniers le taux d'antitoxine est nettement supérieur à celui des premiers.

Actuellement, de nombreux corps microbiens (les salmonelles, les brucelles, les corynebactérium, les bacilles tuberculeux...) sont utilisés en vue d'obtenir un effet adjuvant (58, 69, 23).

Les endotoxines lipopolyosido-protidiques exercent aussi une action stimulante sur la production des anticorps. Cette action se manifeste, d'après LANDY, surtout sur l'intensité de la réponse primaire à un antigène protéique. Cette activité se vérifierait, d'après MAC KENNE et STEVENS, lors de la stimulation antigénique in vitro (synthèse d'anticorps in vitro par des cellules en culture).

CHAPITRE PREMIER

RAPPELS SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE

Dans un but de clarté et pour éviter des répétitions, il nous a paru indispensable de rappeler dans ce chapitre les caractères de la réponse immunitaire et les acquisitions récentes concernant l'origine et le rôle des anticorps. Nous ne parlerons pas de l'hypersensibilité.

1) Caractères de la réaction immunitaire

L'administration d'un antigène se traduit par la formation d'anticorps circulants qui évoluent suivant une courbe comportant :

- une phase de latence de quelques jours,
- une phase de croissance logarithmique ou phase exponentielle de synthèse,
- un plateau qui se maintient un temps variable,
- une diminution plus ou moins rapide.

Suivant la vitesse d'apparition et d'élimination des anticorps et leur taux optimum, on distingue :

1° *La réponse primaire.*

Elle s'observe à la suite d'une stimulation antigénique ; les anticorps apparaissent lentement, leur taux est modéré et leur élimination est rapide.

2° *La réponse secondaire.*

Elle caractérise les individus ayant déjà reçu une injection primaire. On note une baisse passagère des anticorps, s'il en existe : c'est la phase négative. On admet que les antigènes nouvellement injectés, en se combinant avec les anticorps, hâtent leur élimination. La phase négative est suivie d'une augmentation rapide et très importante d'anticorps qui vont s'éliminer plus lentement (DIXON, MAURER, DEICHMILLER). A la suite de l'injection primaire, il persiste dans l'organisme une « mémoire immunologique ». Les anticorps formés dans la réponse primaire sont d'abord des macro-globulines 19 S, puis des globulines 7 S. Lors des réinjections, les β 2 M se reforment comme dans la réponse primaire. UHR et FINKELSTEIN admettent qu'il n'y aurait pas de *mémoire immunologique* pour ce type de globulines.

3° *L'hyperimmunisation.*

La répétition des injections aboutit à l'état d'hyper-immunité ; elle correspond à la capacité maximale d'un animal à synthétiser des anticorps vis-à-vis d'un antigène. Si on poursuit encore les injections, le taux d'anticorps se met à baisser : c'est le phénomène de paralysie immunitaire (18) par neutralisation des anticorps par l'excès d'antigène (phénomène de zone).

4° *La réaction secondaire d'emblée.*

Dans certains cas très particuliers, l'injection secondaire ne provoque aucune élévation anamnétique du taux d'anticorps. Ces réactions secondaires d'emblée ont été décrites par BURNET avec des rickettsies et par HEIDELBERGER (35) chez l'homme avec des polysides pneumococques. Le mécanisme d'action est sensiblement le même. Dans le cas des rickettsies, le germe encore vivant continue à proliférer dans l'organisme ; dans le cas des polysides, l'antigène non dégradé persiste plus ou moins longtemps dans l'organisme.

5° *Paralysie et tolérance immunitaires.*

La paralysie immunitaire de type FELTON est obtenue par une injection d'une dose seuil de certains polyosides de pneumocoques. Elle est due à ce que, chez la plupart des mammifères, il n'existe pas un système de dégradation des polysaccharides et quand ceux-ci sont injectés, ils persistent indéfiniment. La paralysie immunitaire par inondation antigénique de type DIXON et MAURER, s'observe par injection de doses massives d'antigènes. Il s'agit dans les deux cas d'un blocage spécifique, réalisable sur l'animal adulte et ne pouvant être aboli par un apport de cellules immunes. Mais seule la tolérance par inondation est transitoire : les anticorps réapparaissent sans aucune nouvelle immunisation, c'est ce qu'on appelle *l'échappement immunologique spontané* de SERCAZ et COONS (82). Signalons que la rupture de cet état de blocage induit chez des souris par de fortes doses de sérum albumine humaine peut être obtenue par injection du même antigène mélangé à de l'adjuvant de Freund (PARAF et Coll.) (62).

Le phénomène de tolérance immunitaire décrit par OWEN (59) a été expérimentalement étudié par MEDAWAR et Coll. (52). L'expérience fondamentale consiste à injecter à des souriceaux nouveau-nés de race blanche des cellules du système réticulo-histiocytaire de la rate d'une souris noire adulte : c'est l'induction de la tolérance. Les receveurs, même adultes, deviennent tolérants à des greffes de peau provenant du donneur initial. C'est un phénomène général, spécifique et transitoire ; il est limité à l'animal nouveau-né. On peut, toutefois, le réaliser chez l'adulte par différents procédés :

— soit par intervention directe sur le système réticulo-endothélial (exérèse du thymus ou des bourses de Fabricius des oiseaux) ;

— soit par irradiation par des rayons X à doses sub-létales ;

— soit par traitement par les antimétabolites comme la 6-mercaptopurine.

Il existe deux autres types de tolérance : la tolérance aux allergènes de CHASE et la tolérance naturelle aux substances autologues et aux substances hétérologues.

CINADER et DUBERT, PARAF et Coll. constatent que l'injection de l'adjuvant de Freund à des lapins tolérants antérieurement immunisés fait apparaître une réaction immunitaire secondaire. L'adjuvant, selon ces auteurs, supprimerait une action inhibitrice ou déplacerait un équilibre ; il y aurait identité entre tolérance et paralysie immunitaire ; il n'existerait pas de cellules tolérantes mais seulement des cellules en état d'inhibition ou de stimulation (62).

6° *La réaction anamnétique spécifique et non spécifique.*

L'impossibilité de détecter, par les moyens dont on dispose, les anticorps circulants n'est pas une preuve suffisante pour exclure une réaction immunitaire classique. L'existence d'une immunité latente potentielle explique la réponse anamnétique spécifique ; dans ce cas, l'injection secondaire est faite avec le même antigène que celui qui a été utilisé pour l'injection primaire. La réaction anamnétique non spécifique a été signalée par de nombreux auteurs ; elle est due à une stimulation de l'immunité vis-à-vis d'un antigène par l'injection secondaire d'un antigène différent.

II) **Origine des anticorps**

1° *Etude histo-cytologique de la synthèse des anticorps.*

Les moyens d'étude du rôle cellulaire dans la synthèse des anticorps sont très nombreux :

— en pathologie humaine, certaines affections chroniques (myélomes, leucémie lymphoïde...) sont accompagnées d'anomalies cellulaires et de modifications humorales ;

— l'étude expérimentale sur les cellules d'animaux immunisés se fait par :

- a) la microscopie électronique qui précise la structure des sacs ergastoplasmiques et des particules ribonucléiques ;

- b) la technique de COONS à l'isocyanate de fluorescéine ou la technique de SINGER à la ferritine qui précise la détection de l'antigène ou de l'anticorps dans la cellule ;
- c) la technique des acides aminés marqués au C^{14} qui rend possible l'évaluation de la vitesse et la capacité relative de synthèse des différents tissus ;
- d) l'inhibition ou la stimulation partielle ou progressive par des radiations et des antimétabolites qui permet de préciser le rôle de chacun des constituants de la cellule dans la synthèse des anticorps ;
- e) le transfert du mécanisme formateur d'anticorps chez un animal incapable par lui-même de s'immuniser qui permet d'identifier les cellules productrices et le taux d'immunité produit en fonction du nombre de cellules injectées (immunité adoptive) ;
- f) la culture des cellules du système réticulo-endothélial, leur immunisation et l'action de la RNase sur ces cellules.

Nous pouvons schématiser les résultats obtenus par ces différentes techniques dans le tableau page 97.

2° Rôle du thymus.

Le rôle du thymus dans la réaction immunitaire et dans l'évolution du tissu lymphoïde est resté longtemps méconnu. Nous ne pouvons donner ici qu'un aperçu succinct sur son rôle. Actuellement, des études sur l'action des adjuvants sur le thymus sont en cours.

ARCKER, WAKSMAN et ARNASON, puis SHERMAN et DEFENDI ont démontré, à la suite de MILLER, que la thymectomie pratiquée à la naissance entraîne :

— un syndrome de dépérissement (wasting syndrom) ressemblant aux réactions du greffon contre l'hôte (runtng syndrom) ; mais il en diffère par l'étiologie, car le wasting

syndrom est dû à la non maturation des cellules immunologiquement compétentes et non à une réaction immunologique (55) ;

— une perte du pouvoir à rejeter les homogreffes et une altération du mécanisme producteur des anticorps (MILLER, PAPEMASTER), du moins vis-à-vis de certains antigènes (PAROTT) ;

— une diminution de l'aptitude des lymphocytes prélevés chez ces animaux à provoquer chez d'autres souris la réaction du greffon contre l'hôte ;

— une déficience très marquée du peuplement en lymphocytes. Les plasmocytes diminuent peu, par contre les lymphocytes circulants subissent un abaissement très marqué (54).

On peut empêcher ces troubles provoqués par thymectomie par plusieurs procédés :

— soit par greffe de thymus de souriceau nouveau-né histo-compatible ;

— soit par administration, peu après l'ablation, de cellules prélevées dans des ganglions lymphatiques d'adultes histo-compatibles ;

— soit par implantation intrapéritonéale de fragments de thymus inclus dans des chambres de diffusion.

De ces différents travaux, on peut déduire que le thymus est indispensable :

— à l'établissement initial de la potentialité immunologique ;

— à la restauration de cette fonction lorsque celle-ci a été artificiellement détruite ;

— au maintien de ce potentiel à un niveau élevé chez l'adulte.

III) Rôle des anticorps

EHRLICH a introduit la notion de l'« horror auto-toxicus » selon laquelle, par un véritable postulat, les antigènes doivent être exogènes ou endogènes mais modifiés. Les anticorps, comme leur dénomination le montre bien, auraient une activité purement défensive et intelligente. Mais, dans ce cas, on s'explique mal leur intervention dans le choc anaphylactique, le rôle de certains anticorps comme les anticorps anti-H des salmonelles et le mécanisme des auto-anticorps (24).

GRABAR leur attribue un rôle physiologique très général de transporteurs des produits du catabolisme avec lesquels ils s'unissent d'une manière spécifique. Cette notion éliminerait la nécessité postulée de l'origine exogène des antigènes. Replacée dans le cadre général de l'homéostasie, la réaction immunitaire pourrait alors être considérée comme une exacerbation soudaine et momentanée d'un mécanisme physiologique normal de la synthèse des globulines.

CHAPITRE II

MOYENS D'ETUDE

L'étude de la stimulation par les adjuvants de la réaction immunitaire peut se faire soit par des méthodes sérologiques, soit par des méthodes immunologiques.

— Les méthodes sérologiques : la mise en évidence et le titrage des anticorps se fait par des réactions d'agglutination, de précipitation, d'hémagglutination ou de fixation du complément. Ces réactions sont fidèles, simples et précises. On obtient des résultats chiffrables qui permettent de suivre chez un sujet la variation du taux des anticorps. Mais il existe des maladies comme la tuberculose où l'on n'a jamais pu déceler d'anticorps protecteurs chez des sujets efficacement vaccinés (CANETTI) ; il en est d'autres comme la poliomyélite où les anticorps protecteurs ne semblent pas être seuls en cause (14, 57). Quant au vaccin antioquelucheux, depuis les travaux de PILLMER et de BILLAUDELLE, on fait une distinction nette chez *Bordetella pertusis* entre l'agglutinogène et un autre antigène qui est seul responsable de la vaccination. Ce ne sont que des méthodes approchées.

— Les méthodes immunologiques proprement dites : elles consistent à vacciner par exemple trois lots d'animaux :

le premier lot avec l'antigène seul ;

le deuxième lot avec l'antigène additionné d'un adjuvant connu de référence ;

Le troisième lot avec l'antigène contenant l'adjuvant à étudier.

Les injections d'épreuve, faites à des intervalles de temps réguliers, permettent d'apprécier l'activité de l'adjuvant. Cette méthode est longue et onéreuse ; mais elle reflète mieux l'état de résistance surtout dans les cas des maladies où l'immunité est en plus ou moins grande partie de nature tissulaire.

Quant à la séro-protection, elle présente à peu près les mêmes avantages et les mêmes inconvénients que les méthodes sérologiques simples. Elle peut servir de moyen complémentaire à l'étude de l'activité de l'adjuvant.

Envisageons les conditions qu'il est nécessaire de respecter pour mener à bien une expérimentation sur les adjuvants de l'immunité.

I) Le choix des animaux

Tous les animaux peuvent être utilisés expérimentalement. Le choix de l'espèce dépend de la nature de l'antigène ; pour les antigènes protéiques, on utilisera le lapin, la souris ou le cobaye ; pour les bactéries ou les virus, on prendra l'espèce la plus sensible et pouvant servir à une étude statistique. Si le sexe et la race ont une importance secondaire, l'âge au contraire est un facteur essentiel, surtout pour l'étude de la tolérance immunitaire.

Les conditions de logement et d'alimentation doivent être identiques pour les animaux inoculés et les témoins.

II) L'antigène

L'antigène doit présenter certaines conditions :

1° Conditions générales :

— Il doit être exempt de toute impureté afin d'éviter des erreurs dans le titrage des anticorps ; ces impuretés ne

doivent pas non plus jouer le rôle d'adjuvant. Il se peut aussi que l'apparition d'anticorps précipitants ou agglutinants contre un constituant mineur de la molécule antigénique injectée avec l'adjuvant va hâter l'élimination des antigènes ; on a ainsi une idée fausse de l'activité adjuvante de la substance utilisée. L'unispécificité n'est pas nécessaire si on dispose d'un immunogène repérable par une activité biochimique ou biologique dosable telle qu'un virus, une toxine, une hormone, un enzyme et si cette activité est inhibée par la combinaison antigène-anticorps.

— Il ne doit pas se combiner aux adjuvants, ni être dénaturé par eux.

— Il ne doit pas présenter de communauté antigénique avec l'adjuvant (cas particulier de l'adjuvant de Freund).

2° Conditions spéciales :

... ..

Elles dépendent de chaque antigène en particulier. Rappelons seulement que la réaction de l'organisme à une stimulation antigénique dépend de la nature de l'antigène et de sa structure.

III) Les voies d'inoculation

En principe, toutes les voies sont possibles ; en fait, on est limité par la nature de l'adjuvant et la durée de l'expérimentation. Toutes les voies qui risquent de perturber la physiologie générale de l'animal sont à éviter (5).

IV) Le choix de l'adjuvant

Les conditions qui guident son choix ont été signalées à propos de l'antigène ; souvent on fait une étude comparée de plusieurs adjuvants aqueux. Etant donné que l'activité de l'adjuvant dépend de la nature des antigènes vaccinaux, son choix, vu l'aspect encore fruste de nos connaissances sur les facteurs immunogènes, que ce soit d'une bactérie, d'un virus ou d'une toxine, se fait le plus souvent par

tâtonnement. Ainsi, dans la standardisation internationale des vaccins, on procède essentiellement par comparaison des antigènes. Mais, les adjuvants qui agissent comme « multiplicateur » des effets des immunogènes et qui, finalement, conditionnent l'activité mesurable, restent au second plan. C'est pourquoi il est nécessaire, pour avoir une valeur objective d'un vaccin, de comparer, en dehors des antigènes, les adjuvants entre eux et en fonction d'un adjuvant de référence, et, dans ce cas, l'adjuvant de Freund serait tout indiqué.

V) Volume et concentration de l'adjuvant

Des essais préliminaires sont nécessaires pour déterminer le volume et la dilution de l'adjuvant. Ceux-ci varient avec les différents échantillons d'un même produit (75). Pour certains adjuvants, le pouvoir toxique et les réactions inflammatoires qu'ils déclenchent limitent la dose pour deux raisons (58) : *toxicité* (intolérance) locale et générale ; *inefficacité* (l'action hyperphlogogène escarri-fiante séquestre et élimine l'antigène, ce qui va à l'encontre du but recherché).

VI) Délais des inoculations

Par définition, l'antigène est l'adjuvant sont inoculés en même temps, au sein de la même préparation vaccinale.

Dans un dessein de recherche, l'injection de l'adjuvant peut être faite avant celle de l'antigène ; ce procédé permet d'étudier expérimentalement le mode d'action de l'adjuvant et de déterminer l'importance relative de la réaction locale et de la stimulation générale du système réticulo-histiocytaire.

Des expériences en cours de PARAF et Coll., où des inoculations différées d'adjuvant de Freund et d'antigène vont permettre de préciser l'importance de la durée de ce

délai sur la synthèse des anticorps. On peut affirmer déjà que, si ce délai augmente, on observe :

- un taux d'anticorps plus élevé ;
 - une diminution du temps de latence ;
 - qu'une augmentation de la quantité d'antigène est nécessaire pour obtenir le taux optimal d'anticorps.
-

CHAPITRE III

ETUDE QUALITATIVE DE LA STIMULATION DE LA REACTION IMMUNITAIRE PAR LES ADJUVANTS

Dans les généralités, nous avons examiné l'aspect quantitatif de la stimulation de la réaction immunitaire par les adjuvants. Un nombre considérable de travaux est consacré à ce sujet. Nous allons essayer, dans ce chapitre, d'envisager l'aspect *qualitatif* des modifications de la réaction immunitaire par les adjuvants. Peu de travaux ont été consacrés à ce problème.

A une sollicitation antigénique avec un antigène *mono-spécifique*, l'organisme répond par des anticorps multiples, par des « familles » d'anticorps, comme disent les immunologistes, dont les principales sont :

— les immunoglobulines gamma (7 S), anciennes gammaglobulines ;

— les immunoglobulines A (7 S), anciennes bêta₂A globulines, ou γ G ;

— les immunoglobulines macromoléculaires (19 S), anciennes bêta₂M globulines, ou γ M.

Les analogies et les différences entre ces trois familles de globulines peuvent être attribuées, soit à la nature

immunochimique de l'immunogène, soit au *mode d'immunisation*. L'extrême complexité de l'influence des adjuvants sur la synthèse de ces différents types d'anticorps vient du fait qu'ils agissent pour la plupart à ces deux niveaux. Nous étudierons successivement le rôle de l'adjuvant sur la variation qualitative des anticorps au cours de l'immunisation, en faisant abstraction de la voie d'introduction de la dose et de la nature de l'antigène, puis leur rôle dans l'établissement de l'hypersensibilité retardée ; nous rapporterons enfin quelques constatations faites sur le lien entre adjuvant et mémoire immunologique.

1) Rôle de l'adjuvant sur la variation qualitative des anticorps au cours de l'immunisation

Les immunoglobulines macromoléculaires sont précoces (2^e ou 3^e jour d'immunisation) ; elles apparaissent lors de la stimulation avec un antigène additionné ou non d'adjuvant. Si on utilise un adjuvant, le temps de latence de la réaction est raccourci ou supprimé. Ces immunoglobulines macromoléculaires apparaissent très rapidement et à un taux très élevé. Elles se mettent à baisser rapidement ; leur demi-durée de vie est courte. Leur catabolisme se fait (21, 37) progressivement et porte sur une liaison particulière puisque les différentes globulines rencontrées à ce moment sont des 17 S, 15 S, 13 S, 11 S, 9 S et 7 S. Ce remaniement structural aboutit à des globulines 7 S ayant la même spécificité que les immunoglobulines macromoléculaires d'origine, mais cette spécificité est plus stricte ; les immunoglobulines macromoléculaires ont toujours plus de deux sites actifs, alors que les immunoglobulines gamma ont seulement deux sites ; les immunoglobulines A sont bivalentes ou monovalentes. Les adjuvants *stimulent* la production des immunoglobulines macromoléculaires et favorisent leur *catabolisme*, ce qui aboutit à une formation importante d'immunoglobulines gamma.

Mais les adjuvants agissent également sur les cellules qui élaborent directement les immunoglobulines gamma en

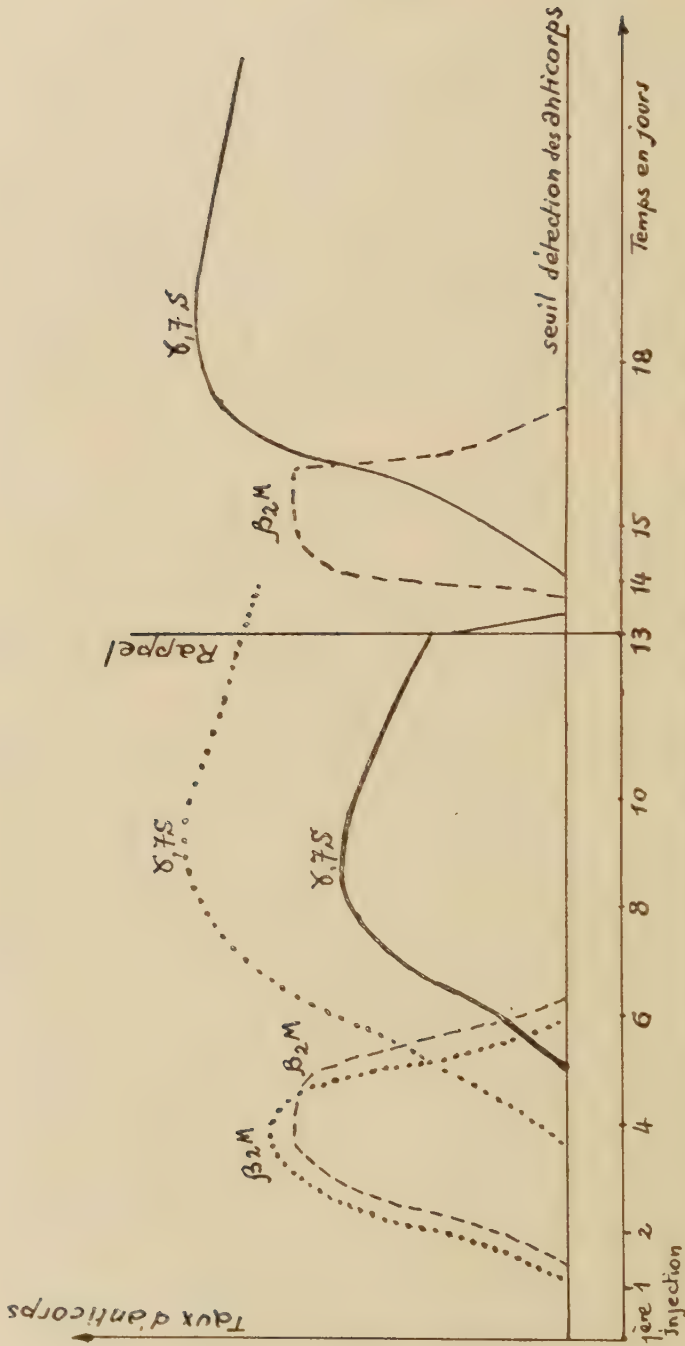
activant leur multiplication et leur maturation. Ces cellules (plasmocytes et moyens lymphocytes) entrent en activité sécrétrice plus lentement, parce que moins phagocytaires, elles entrent en contact avec l'antigène plus tardivement.

En résumé, la précocité de la réaction immunitaire et l'atteinte rapide du taux optimal des anticorps immunoglobulines gamma circulants à la suite de l'utilisation d'un adjuvant résulte de la stimulation d'un plus grand nombre de cellules sécrétrices d'immunoglobulines macromoléculaires et gamma d'une part, et de l'activation du catabolisme des immunoglobulines macromoléculaires d'autre part.

Il est plus difficile de trouver des rapports entre les immunoglobulines gamma et les immunoglobulines A. Les immunoglobulines A sont plus tardives et plus persistantes. Elles s'observent dans l'hyperimmunisation. La prolongation de l'état d'immunité par les adjuvants serait probablement liée à ce type d'anticorps (22).

Le problème de l'*avidité* est très important. Découverte par GLENNY sur le sérum antidiphthérique, retrouvée par CINADER pour le sérum antitétanique, elle se traduit par le fait qu'un sérum antitoxique présente un pouvoir neutralisant très diminué lorsqu'on le détermine dans un milieu dilué. Les anticorps non avides peuvent être obtenus à concentration relativement élevée par immunisation rapide de chevaux dépourvus d'immunité préalable. La même observation a été faite par RAYNAUD, TURPIN, RELYVED, CORVAZIER et GIRARD lors de l'immunisation de chevaux avec l'anatoxine tétanique. Tous ces auteurs concluent que l'avidité des anticorps (immunoglobulines gamma et A) produits en réponse à la stimulation antigénique dépend essentiellement de l'existence ou de l'absence d'une *immunité de base ancienne* (GLENNY et BARR). Lorsque celle-ci existe, les anticorps formés sont *avides*, même lorsqu'ils sont présents à *faible concentration* (3, 30).

La mesure de la constante d'association de l'antitoxine



Courbe représentant l'évolution des différents types d'anticorps au cours de l'immunisation et de l'hyperimmunisation.

..... Immunisation avec un antigène additionné d'un adjuvant.
 Immunisation primaire et rappel avec un antigène seul.

et des autres éléments thermodynamiques de la combinaison, et la comparaison de sérums résultant de l'immunisation avec et sans adjuvants, constitueraient les seules mesures valables du degré d'avidité du sérum et de l'influence de l'adjuvant sur l'avidité. Pour le moment, il y a autant d'arguments pour que d'arguments contre cette influence de l'adjuvant. Mais il est démontré que l'avidité est d'autant plus grande que le temps qui sépare la première immunisation et l'injection de rappel est plus long. Il se pourrait alors que l'adjuvant intervienne indirectement en permettant d'obtenir un sérum de même avidité que celui obtenu dans une hyperimmunisation *en réduisant le temps* qui sépare la première injection et le rappel.

II) Rôle de l'adjuvant dans l'établissement de l'hypersensibilité retardée

De nombreuses bactéries, vivantes ou tuées, additionnées ou non de paraffine, permettent, quelle que soit la voie d'introduction, de créer un état d'hypersensibilité retardée. Dans ce domaine, les mycobactéries constituent un modèle d'étude. La *Cire D*, extraite par RAFFEL, ne détermine une hypersensibilité retardée que si elle est injectée avec une autre protéine (tuberculine, ovalbumine...) ; un lipopolysaccharide ayant des propriétés identiques à la *Cire D* a été isolé par CHOUCROUN. Cette hypersensibilité est dirigée vers la protéine seule. KORILSKY et CHOUCROUN ont démontré que cette hypersensibilité pouvait être provoquée par des lipopolysaccharides purifiés et des lipides bactériens. Ces substances ont la propriété de réagir et de se fixer très facilement à des protéines ; c'est pourquoi elles se comportent comme des « haptènes ». Il peut y avoir, quelquefois, production d'anticorps sériques contre l'adjuvant, à la suite d'injections répétées (ce qui a été démontré pour l'adjuvant de Freund et des adjuvants d'origine bactérienne) ; dans ces cas, des phénomènes d'hypersensibilité immédiate (anaphylaxie et phénomène

d'Arthus) précèdent ou se superposent à l'hypersensibilité retardée.

L'hypersensibilité retardée est liée à des anticorps *fixés à des cellules lymphocytaires*. Leur extraction a pu être réalisée. Des expériences récentes montrent qu'en dehors de l'antigène l'action de l'adjuvant porte essentiellement sur les lymphocytes. Or, d'après certains auteurs, il existerait des différences qualitatives entre les cellules compétentes : certaines produisent des anticorps qui sont libérés (anticorps sériques), les autres les conservent à leur surface (anticorps fixes) ; d'autres auteurs pensent que les deux types de réaction des cellules compétentes représentent deux étapes successives du même processus immunologique : les mêmes cellules dans une première phase, après la stimulation antigénique, seraient du type lympho-histocytaire et donneraient l'hypersensibilité retardée et, par la suite, deviendraient des plasmocytes et produiraient les anticorps circulants (22). L'utilisation de l'adjuvant de Freund confirme donc cette dernière hypothèse. La stimulation de la réaction par anticorps avec un adjuvant ne serait que la conséquence de l'hypersensibilité retardée (33, 69) ; plus l'hypersensibilité retardée est intense et courte, plus l'effet de l'adjuvant sur la synthèse des anticorps est rapide et accru. Bon nombre d'arguments plaident contre cette hypothèse ; mais il est peut-être encore trop tôt pour trancher la question, surtout depuis la conception dite « à deux étages » de la formation des anticorps (captation et concentration de l'antigène par les cellules du S. R. E. Celui-ci, « démasqué », est transmis aux plasmocytes qui synthétisent des anticorps) confirmée par la découverte, au microscope électronique, de la plasmotose. La plasmotose plaiderait pour un balancement et contre une proportionnalité entre l'hypersensibilité et la synthèse des anticorps. Si on admet l'hypothèse classique de l'autonomie de ces deux types de réaction, l'adjuvant agirait alors aveuglément sur l'une et sur l'autre. Il est aussi possible d'admettre que, lors des réinjections, l'adjuvant, par son pouvoir stressant,

libère une certaine quantité d'anticorps préformés. Ces anticorps forment un complexe avec l'antigène injecté. Ce complexe, plus facilement phagocyté (7), favorise d'une part l'élaboration des anticorps, d'autre part, à un certain rapport $\frac{\text{antigène}}{\text{anticorps}}$ détermine une hypersensibilité retardée.

III) Adjuvant et mémoire immunologique

Il est curieux de constater que certains lipopolysaccharides et certains lipides utilisés seuls, comme antigène, sollicitent l'élaboration d'anticorps de type immunoglobulines macromoléculaires (19 S) pour lesquels l'organisme ne possède pas de mémoire immunologique ; utilisés comme adjuvants, ils favorisent la synthèse d'anticorps contre l'immunogène auquel ils sont associés ; utilisés comme antigènes ou comme adjuvants, ces substances persistent longtemps, parfois indéfiniment, dans l'organisme et suscitent ainsi indéfiniment la formation d'anticorps. Leur activité est liée au mode de dégradation qu'elles subissent dans l'organisme et, par conséquent, à l'espèce animale considérée.

Pour les antigènes protéiques, il y a dégradation enzymatique ; mais il semble qu'il persiste des traces d'antigène très longtemps, non négligeables, si on considère non pas le poids, mais le nombre de molécules par cellule éventuellement responsable de la formation des anticorps (DIXON). Un fait mis en évidence et dont la signification est restée minime est la présence de traces d'antigène dans le noyau de toutes les cellules compétentes examinées.

CHAPITRE IV

MECANISME D'ACTION

L'exaltation de l'immunogénèse par les substances adjuvantes relève de processus se développant au niveau des cellules génératrices d'anticorps et de phénomènes neuro-endocriniens. Nous allons examiner successivement le mode d'action de l'adjuvant sur l'immunogène et la cellule compétente, puis son effet neuro-endocrinien.

1) Facteurs liés à l'antigène et à la cellule compétente

1° Fixation de l'antigène dans l'organisme.

L'adjuvant intervient dans la persistance de l'antigène au point d'inoculation soit par la réaction inflammatoire locale qu'il déclenche, soit par modification physico-chimique de l'antigène. L'antigène adsorbé sur des particules colloïdales ou précipité en agrégats, ainsi que le granulome résultant de l'inflammation, entraînent une résorption lente de l'antigène. Celui-ci, libéré peu à peu, va stimuler un nombre plus élevé de cellules compétentes et maintenir cet état très longtemps.

HARRISON (34) constate que le granulome réalisé en inoculant 150 U.F. d'anatoxine diphtérique fluide dans le

coussinet plantaire du lapin est antigéniquement actif à la septième semaine ; si on broie le nodule formé dans de l'eau physiologique et qu'on injecte le surnageant à des animaux neufs, on déclenche une réponse immunitaire antitoxique. Toutefois, plusieurs faits invitent à une certaine circonspection. En effet, depuis longtemps, RAMON et LEMETAYER (47), puis HOLT, ont démontré que, 7 à 10 jours après l'injection d'un vaccin additionné de phosphate d'aluminium, le nodule formé s'encapsule. Au bout de 14 jours, son enkystement est complet. Si, à ce moment, le nodule est extirpé, on n'observe qu'une faible différence entre la courbe d'immunité de ces animaux privés de leur nodule et celle des animaux qui l'ont conservé jusqu'à dissipation. Implanté sous la peau de cobayes immunisés par une injection préalable, il ne provoque pas de stimulation secondaire.

POPOVICI et GOGOASA (67) procèdent à l'inoculation de souris par la voie sous-cutanée avec un complexe culture de bouillon de pasteurelles, additionné d'hydroxyde d'alumine. Deux jours après l'inoculation, le nodule formé est extirpé. Les animaux ainsi opérés sont protégés contre une injection d'épreuve. La substance non résorbée du point d'inoculation perd rapidement son pouvoir immunogène. Ces auteurs concluent que l'antigène aluminé est résorbé tel quel ; il s'agit d'une action directe sur les facteurs immunogènes de l'organisme.

2° Modification de l'adsorption et de la pénétration dans les cellules.

L'adjuvant réalise une dispersion accrue de l'antigène et entraîne une meilleure sollicitation du système réticulo-endothélial. Ceci est particulièrement net pour les adjuvants huileux (78). GURVICH fait remarquer que l'antigène provoque dans les ganglions une accumulation de jeunes plasmocytes suivie de l'apparition d'anticorps dans les ganglions, puis dans le sérum. Les antigènes corpusculaires étendent leur action à tout le système lymphoïde et, par

l'action détersive de leur fraction lipidique, ils réalisent une meilleure adsorption sur la paroi cellulaire et une meilleure pénétration de l'antigène (95, 100).

3° Activation de la phagocytose et de la multiplication cellulaire.

Les adjuvants de l'immunité possèdent très souvent, en outre, la propriété d'activer la phagocytose et, parallèlement, d'intensifier la prolifération des cellules du système réticulo-endothélial.

Pour certains, la phagocytose semble jouer un rôle dans le mécanisme d'action des adjuvants. C'est ainsi que SBARRA fait remarquer que les propriétés de la paroi du phagocyte permettent la pénétration de certaines substances, qui ne passent pas normalement.

Mais il est possible de stimuler la fonction phagocytaire du système réticulo-endothélial par des substances comme les hormones œstrogènes ou des émulsions de lipides sans pour autant modifier la réponse immunitaire de l'organisme (95). D'autre part, les lymphocytes et les plasmocytes, qui sont considérés avec le plus de certitude comme étant impliqués dans la synthèse des anticorps, ne sont pas doués de la qualité de phagocytose. Il est probable que ces deux phénomènes, bien que parallèles, ne soient pas interdépendants (69).

4° Différenciation et maturation des cellules compétentes.

Certains adjuvants puissants, comme l'adjuvant de Freund ou l'adjuvant constitué par le *Corynebacterium parvum* tué (NEVEU, BRANELLEC et BIOZZI) entraînent une stimulation de la fonction phagocytaire du système réticulo-endothélial accompagnée d'un état d'hypersensibilité retardée envers l'antigène incorporé à ces adjuvants. SLAVIN a montré l'état d'hypersensibilité retardée envers des protéines émulsionnées dans l'adjuvant incomplet de Freund. HUMPHREY a remarqué que cette hypersensibilité est une

preuve de la différenciation cellulaire. La cellule différenciée a un meilleur pouvoir de captation de l'antigène.

L'augmentation du taux d'anticorps circulants résulte moins de l'accroissement du rendement de chaque cellule que de l'augmentation beaucoup plus accusée du nombre de cellules productrices (39). Les travaux de WHITE et LEDERER, de PERNIS, de BIOZZI et Coll. montrent que les ganglions présentent une augmentation de poids considérable chez les animaux qui ont reçu l'antigène seul. L'étude histologique de ces ganglions montre qu'avec l'adjuvant de Freund, ce sont les lymphocytes et les histiocytes qui prédominent, alors qu'avec l'alun de potassium, ce sont les lymphocytes et les plasmocytes. Ceci prouve que c'est l'adjuvant qui stimule la maturation et la multiplication des cellules inductibles et que ce sont les histiocytes mais surtout les plasmocytes et les lymphocytes qui synthétisent les anticorps. D'autre part, ces expériences laissent entrevoir que ce sont surtout les lymphocytes qui interviennent dans l'établissement de l'état d'hypersensibilité et que cet état n'a pas d'existence autonome mais qu'il s'agit d'une réaction de type classique avec un taux d'anticorps circulants très faible, ce qui confirmerait encore une fois de plus l'hypothèse de KARUSH et EISEN (1962) (45) sur la synthèse des anticorps.

Le mécanisme d'action des adjuvants sur la multiplication des cellules compétentes est encore mal connu ; mais certaines observations plaident en faveur de l'intervention du D.N.A.

LANDY, MAC KENNE et STEVENS ont démontré l'effet adjuvant des endotoxines. FARTHING et HOLT attribuent l'effet adjuvant des bacilles gram négatifs aux lipopolyosides et surtout aux lipoides A (23). Cet effet stimulant est dû à une hyperplasie des cellules productrices d'anticorps sous l'influence du lipopolyoside sans qu'il soit en rapport avec l'action pyrogène de ces derniers. BRAUN, JAROSLOW et TALIAFERRO démontrent que le produit de digestion de l'acide nucléique apporte une rapide reconstitution du

système réticulo-endothélial détruit par une forte dose de rayons X (86, 51). Une faible dose de rayons X appliquée 12 à 18 heures après l'immunisation stimule la production des anticorps. HIRATA et REDLICH constatent que l'injection au hamster d'une dose non toxique de colchicine immédiatement après celle de l'antigène et par une voie différente provoque une augmentation notable de la production d'anticorps (36). On peut conclure que l'endotoxine, comme la colchicine, ou une faible dose de rayons X, en déterminant une destruction précoce de quelques cellules, libèrent des métabolites d'acide nucléique qui viennent stimuler la multiplication des cellules voisines.

II) Facteurs neuro-endocriniens

L'école russe a étudié l'importance du système nerveux central et du système nerveux organo-végétatif dans le contrôle de la synthèse des anticorps. La réponse immunologique, d'après ces travaux, dépend du « type nerveux ». C'est ainsi que VESSEY (91), procédant au titrage des anticorps formés chez des souris constituées en groupes, constate que les animaux isolés, de même que les animaux agressifs de chaque groupe, présentent les titres les plus élevés.

Le rôle des hormones est mieux connu. L'involution de l'appareil immunologique peut être obtenue au moyen de doses fortes et prolongées de glucocorticoïdes. Leurs effets se traduisent par :

- une diminution de la perméabilité vasculaire ;
- une atrophie du S.R.E. ;
- une inhibition de la phagocytose.

Une agression intense et prolongée produirait les mêmes effets.

Lors d'une hémorragie, le taux sanguin des hormones corticoïdes augmente. La saignée des animaux producteurs de sérum est suivie au bout de quelques jours d'une élévation très importante du taux d'anticorps (30). La

saignée produit le même effet qu'une injection de rappel (80). Mais il n'y a pas eu, à notre connaissance, de titrages de ces hormones après la saignée. On peut attribuer logiquement (2) cet effet de rappel à une libération hormonale accompagnée d'une hyperproduction, par la rate, de cellules lymphoréticulaires. Ces hormones diminuent peu à peu et, à partir d'une dose seuil, par leur action anabolique sur les protides et leur pouvoir lymphocytolytique, déterminent une augmentation du taux d'anticorps.

Les œstrogènes augmentent la réponse immunologique, mais leur mode d'action reste encore mal connu (2).

Les adjuvants de l'immunité peuvent accroître la réponse immunitaire en provoquant un léger état de stress. Ce stress entraîne, par voie neuro-hormonale, une activation de la biosynthèse des anticorps ou l'établissement et l'exacerbation d'un état d'hypersensibilité.

CHAPITRE V

APPLICATIONS

Les adjuvants de l'immunité ont reçu de nombreuses applications pratiques dans les différents domaines de l'immunologie. Le but recherché, le plus souvent, est de diminuer la dose d'antigène, donc son action toxique, de réduire le nombre d'injections tout en produisant une immunité plus précoce, plus élevée et plus prolongée. Toutefois, un adjuvant qui se révèle apte à stimuler énergiquement l'immunité engendrée par un antigène donné, peut être totalement dépourvu d'activité vis-à-vis d'autres antigènes. Nous allons envisager quelques stimulants de l'immunogenèse, suivant la nature de l'antigène dans l'immunisation et l'hyperimmunisation.

1) Dans l'immunisation

1° *L'antigène est une toxine ou une anatoxine.*

La vaccination contre le botulisme est réalisée au moyen des anatoxines botuliques A, B, C, D et E obtenues par action simultanée du formol et de la chaleur sur les toxines correspondantes et précipitation par l'alun (88, 68).

Dans la vaccination antidiphtérique et antitétanique, l'anatoxine est additionnée, soit d'alun (RAMON et GLENNY),

soit d'hydroxyde d'aluminium (SCHMIDT) (79), soit de phosphate d'aluminium (HOLT).

2° *L'antigène est un corps microbien atténué ou inactivé.*

La vaccination contre le rouget du porc utilise le vaccin atténué de STAUB à l'hydrate d'aluminium ou le vaccin lysé et saponiné de DELPY et HARS. Le pouvoir allergisant d'*Erysipelotrix insidiosa*, mal connu, semble étroitement lié au pouvoir immunogène, et apparaît lors des accidents de vaccination contre le rouget (JOURBERT). Mais, à l'intérieur d'une espèce bactérienne, il y a des souches à pouvoir immunogène élevé et très faible pouvoir allergène. Le choix de ces souches, leur utilisation dans des adjuvants appropriés permettent de diminuer la dose vaccinante et empêcheraient les accidents allergiques post-vaccinaux grâce à une sollicitation non spécifique de l'organisme et à une meilleure captation des immunogènes dans l'excipient (43).

Depuis longtemps, on admet qu'un vaccin est d'autant plus efficace que la souche microbienne qui a servi à la préparation est virulente. Les vaccins atténués sont immunisants, mais leur efficacité est moindre. Le rapport entre le degré d'atténuation et le degré de diminution du pouvoir immunisant est mal connu. L'ignorance quasi totale, pour la grande majorité des microbes, de la nature chimique du support de la virulence et des antigènes vaccinaux, du rapport de la virulence et du pouvoir immunogène, oblige très souvent les immunologistes à utiliser des souches sous leur forme aussi complète que possible. Le choix est porté sur des souches lisses (SMOOTH), virulentes ou atténuées. Dans certains cas, il a été démontré qu'un ou plusieurs antigènes protecteurs sont liés aux lipopolysidoprotéines responsables de la forme S. Souvent, cette endotoxine n'a de rapport ni avec le pouvoir immunogène, ni avec la virulence. Toutefois, même dans ces cas, sa présence dans les vaccins reste intéressante parce qu'elle agit comme adjuvant de l'immunité vis-à-vis de tous les antigènes injectés (qui sont pour la plupart inutiles, voire nuisibles), et en

particulier vis-à-vis des immunogènes responsables de la protection recherchée.

Les lipopolyosidoprotéines des souches S, comme tous les adjuvants, n'ont pas une action *élective* sur les immunogènes, et la plupart des anticorps qui apparaissent, quel que soit leur titre, constituent les témoins d'une stimulation antigénique et non les supports d'un état d'immunité.

La prémunition contre l'entérite paratuberculeuse des bovidés est obtenue par l'injection sous-cutanée d'une suspension de bacilles de Johne vivants, cultivés sur milieu Sauton-fléole, en milieu irrésorbable, constitué d'huile de vaseline, d'huile d'olive et de grès porphyrisé. Il en est de même pour le vaccin de Ch. Dubois qui prémunise contre la brucellose bovine et la mélitococcie ovine et caprine (87); l'excipient comprend de l'huile de vaseline et de la lanoline avec adjonction de lycopode. On sait, d'autre part, que la bactériidie charbonneuse inactivée n'est pas immunogène; enrobée dans de la lanoline ou dans un excipient huileux, elle détermine une immunité efficace; il y a « stimulation de la valeur antigénique intrinsèque » (RAMON). Actuellement, le vaccin anticharbonneux gélosé aluné préparé d'après le principe de RAMON et STAUB est utilisé dans de nombreux pays.

3° *L'antigène est une particule virale ou une cellule infectée.*

Très souvent, dans la vaccination antivirale, la pluralité des variétés antigéniques des virus nécessite la mise au point de vaccins polyvalents; c'est le cas du virus aphteux, du virus de la poliomyélite et des adénovirus... Mais les vaccins polyvalents ne déterminent pas une immunité simultanée et au même degré contre les différents antigènes (48). L'activité adjuvante de l'hydroxyde d'aluminium et de la saponine se manifeste avec une netteté particulière dans le vaccin anti-aphteux.

Les adjuvants s'intègrent à la notion de synergie entre les antigènes (type T. A. B. D. T.). Or, dans les vaccins

contre certaines infections virales et en particulier dans le vaccin anti-aphteux, il y a concurrence des différents types de virus, sauf si les adjuvants utilisés sont suffisamment puissants (saponine) pour rendre efficace la vaccination trivalente.

Le vaccin antigrippal de SALK est constitué par un antigène formolé polyvalent en suspension dans un mélange d'huile minérale (Arlacel) (78). Dans ce vaccin, PONTECORVO a mis en évidence la supériorité de cet adjuvant sur le gel d'alumine (66).

Pour éviter les troubles d'hypersensibilité engendrés dans certains cas par la vaccination antirabique (76), JACOTOT (38) prépare un vaccin au latex d'*Hévéa brasiliensis*.

4° *La vaccination associée.*

Depuis les travaux de RAMON et Coll. sur l'action *synergique* de deux vaccins associés, la vaccination antityphoparatyphoïdique T.A.B., additionnée parfois d'anatoxines diphtérique et tétanique, est devenue classique. Ici, l'adjuvant est représenté par les corps bactériens et les endotoxines de *Salmonella* (72, 73).

Le vaccin quadruple antidiphtérique-coquelucheux-tétanique-poliomyélitique engendre une immunité à condition d'employer un vaccin suffisamment puissant. En effet, d'après SOHIER, l'anatoxine diphtérique stimule l'immunisation antitétanique, le vaccin bactérien et endotoxique anticoquelucheux exerce le même effet sur l'anatoxine diphtérique. Mais les antigènes anticoquelucheux exercent une action dépressive sur le vaccin antipoliomyélitique (48) ; d'où la nécessité d'un rappel avec un vaccin antipoliomyélitique seul (LÉPINE).

En médecine vétérinaire, les associations vaccinales antivariolo-Newcastle, anticlavelée-charbon bactérien, et bien d'autres, sont courantes.

Dans les vaccinations associées, les immunogènes ont

une action synergique réciproque. Mais on connaît déjà, depuis les travaux de MICHAELIS (53) (1904), que lorsqu'on immunise des animaux avec des mélanges d'antigènes de spécificité différente, la quantité d'anticorps trouvée pour chaque constituant est inférieure à la quantité trouvée lorsque celui-ci est injecté seul. Il y a *compétition* des antigènes au niveau de la cellule. Ces faits sont confirmés par certains (ADLER), et niés par d'autres (HEIDELBERGER et Coll.) (35). En fait, comme le démontrent BARR et Coll., ce sont les conditions d'immunisation qui font évoluer une vaccination associée vers une activité synergique ou compétitive des antigènes. C'est pourquoi la composition du mélange des vaccins, la voie d'inoculation et les délais doivent être soigneusement étudiés.

II) Dans l'hyperimmunisation

Dans les Instituts producteurs de sérum, l'intérêt des adjuvants est évident. Ils permettent de réduire le nombre des interventions et l'obtention en un temps relativement court d'un sérum de titre nettement plus élevé. Mais, un bon nombre d'adjuvants provoque, chez le cheval, l'animal le plus utilisé pour la production des sérums, des réactions telles que l'état général s'en trouve gravement affecté. On n'utilise plus, actuellement, que l'alun de potassium et le phosphate de calcium que le cheval supporte assez bien.

L'hyperimmunisation peut être recherchée en domaine d'élevage dans certains cas. En effet, pendant l'immaturité immunologique, le jeune animal se trouve mal protégé contre les infections provenant du milieu très pollué dans lequel il se trouve. Mais on sait, depuis longtemps, que les mammifères et les oiseaux (20) transmettent leurs anticorps naturels et artificiels à leurs descendants (94). Cette transmission se fait pour certaines espèces *in utero*, au cours de la grossesse (60) (femme, lapine, cobaye), pour d'autres espèces, par l'intermédiaire du *colostrum* (équidés, bovidés, ovins), pour d'autres espèces, enfin, ces deux types de transmission peuvent intervenir (chien, rat, souris). Des

dosages ont montré que la présence d'anticorps dans le colostrum ou dans le sang du fœtus et du nouveau-né, à un taux suffisamment élevé pour donner une protection, n'est possible que si la mère est fortement immunisée. C'est pourquoi l'adjonction d'un adjuvant de l'immunité, en augmentant le taux des anticorps maternels, favorise la protection indirecte du nouveau-né au cours des premiers jours de la vie. C'est ainsi que, dans les entérotoxémies du mouton, la maladie se manifeste et évolue chez les agneaux dans les 8 à 10 jours qui suivent la naissance ; le seul moyen efficace de lutte réside dans la vaccination des femelles gestantes dans les deux premiers mois. Le nouveau-né bénéficie alors d'une immunité passive transmise par la mère. Notons que, même en médecine humaine, on tend de plus en plus à vacciner la femme enceinte, afin que les anticorps protègent pendant 4 à 6 mois le nouveau-né qui sera néanmoins vacciné au troisième mois.

Des expériences récentes montrent que, dans de nombreuses espèces, les animaux privés d'anticorps d'origine maternelle ne synthétisent pas d'anticorps quand on les soumet à des stimulations antigéniques vers l'âge de 3 à 8 semaines (1). Au contraire, ceux qui en ont reçu produisent des anticorps circulants. Pour déclencher cette réaction, il est nécessaire de fournir à l'animal des anticorps préformés. Il est possible de surmonter l'incompétence immunologique des jeunes animaux en mélangeant l'antigène à de petites quantités d'anticorps présents dans des sérums d'animaux hyperimmunisés, ou même des sérums d'animaux adultes normaux (81). On pense que si une grande quantité d'anticorps est administrée passivement, elle a un effet inhibiteur sur l'élaboration des anticorps identiques, alors qu'une quantité plus faible a un effet stimulant qui serait dû à la présence de quelques complexes antigène-anticorps. L'utilisation, chez la mère, d'un vaccin contenant un adjuvant permet, non seulement de réaliser cette vaccination avant la période de la gestation où la vaccination peut entraîner des accidents, mais aussi le maintien, chez la mère, d'un taux d'anticorps assez élevé

pour en transmettre à son produit. La quantité devra être assez faible pour le protéger et par conséquent pour inhiber une synthèse active, mais encore suffisante pour constituer, lors d'une vaccination précoce, avec l'antigène injecté, un complexe favorisant la réponse immunitaire et la protection du fœtus.

III) Quelques inconvénients de l'emploi des adjuvants

Ces inconvénients varient d'un adjuvant à l'autre. Ils dépendent aussi de l'immunogène et de sa structure physico-chimique. A ces divers facteurs, il faut mentionner le rôle de l'espèce, de la race et de l'individu. Toutefois, les deux inconvénients majeurs, les plus souvent signalés, sont : la réaction au point d'inoculation et les manifestations d'état d'hypersensibilité retardée, toutes deux liées à un excès d'adjuvants. Il y a un « phénomène de zone » lié à l'adjuvant : il ne faut ni trop peu (inefficacité), ni trop (inefficace et dangereux).

1° *La réaction locale.*

L'adjuvant détermine, au point d'injection, une réaction inflammatoire plus ou moins intense, évoluant, dans quelques rares cas, vers l'abcédation, le plus souvent vers la formation d'un granulome de volume variable qui se résorbe lentement. On a longtemps attribué une importance considérable à cette réaction locale (49). Mais, à ce propos, BASSET (5) écrivait : « la lésion locale est exclusivement nuisible pour l'organisme, d'autant plus qu'elle est plus intense » ; il ajoute : « ce n'est qu'une trompeuse apparence ». Nous venons de voir en détail ce qu'il faut en penser au sujet du mécanisme d'action des adjuvants.

2° *L'état d'hypersensibilité retardée.*

Depuis longtemps, des troubles neurologiques, consécutifs à la vaccination antirabique (76), ont été observés chez l'homme et les animaux. SURDAN et Coll. (85) relèvent

les mêmes symptômes sur 20 chiens ayant reçu le vaccin antirabique à l'alun. Parmi ces chiens, 14 étaient vaccinés *pour la première fois*. Les examens histologiques du névraxe de ces animaux mettent en évidence une méningo-encéphalomyélite et une névrite démyélinisante périvasculaire de type allergique. Ces lésions ont été reproduites en utilisant des adjuvants puissants comme l'adjuvant de Freund chez le singe, le chien, le lapin, le cobaye et la souris, soit avec la substance nerveuse rabique, soit avec la substance nerveuse saine (40, 31).

L'effet stimulant de l'adjuvant s'exerce sur la sensibilité des individus à la substance nerveuse ; c'est pourquoi il faut exclure l'emploi des adjuvants et particulièrement des adjuvants lipidiques des vaccins à base de substances nerveuses.

DEUXIEME PARTIE

**ETUDE SUCCINCTE DE L'ACTIVITE ADJUVANTE
ET STIMULANTE DE L'IMMUNITE D'UN EXCIPIENT
HUILEUX HYDROPHILE INTERESTERIFIE**

GENERALITES

I) Définition

L'excipient huileux hydrophile considéré est un Labrafil* : l'huile de noyaux interestérifiée. Il porte dans la liste des produits de la Société Gattefossé S.F.P.A. la référence M. 1944 C, conforme aux « glycérides oléiques polyoxyéthylénés » de la nouvelle pharmacopée française, 8^e édition.

II) Préparation

On fait réagir, pendant 8 heures, à la pression atmosphérique, entre 205 et 230° C, un triglycéride avec un polyalcool, le polyoxyéthylèneglycol 300, en présence de catalyseurs. On obtient ainsi un mélange en proportion constante de mono- et de diesters de polyoxyéthylèneglycol (mono- et dipolyglycides) et de mono-, di- et triesters du glycérol (monoglycérides, diglycérides, triglycérides).

L'interestérification est suivie d'une neutralisation et d'une filtration jusqu'à l'obtention d'un produit répondant strictement à des normes analytiques définies.

III) Propriétés physico-chimiques

1° Propriétés physiques :

Couleur : jaune paille.

Odeur : celle de l'huile de noyaux.

Densité à 20° = 0,940 à 0,965.

Indice de réfraction : $n^{20} = 1,465 - 1,475$.

D

* Brevet Gattefossé-Mahler.

2° *Propriétés chimiques :*

Acidité libre exprimée en acide oléique : inférieure à 1 %.

Indice de saponification : 145 — 175.

Indice d'iode (méthode de Wijs, Hofmann et Green) : 60 — 90.

Teneur en eau : inférieure à 0,5 %.

Absence de soufre et de métaux lourds.

3° *Solubilités :*

Huile de paraffine	très soluble
Ether de pétrole	« «
Chloroforme et éthydiéthylèneglycol	« «
Huiles végétales et alcools gras	« «
Alcool éthylique	assez soluble
Glycérine et glycols	insoluble
Eau	insoluble mais dispersible

4° *Intérêt des propriétés physico-chimiques :*

Le Labrafil présente la propriété remarquable d'être soluble à froid et en toute proportion dans les hydrocarbures et les huiles végétales. Il est également dispersible à froid dans l'eau avec formation d'une émulsion opaque en phase continue aqueuse.

Le Labrafil est un des glycérides interestérifiés qui ont permis de réaliser le lien entre les excipients aqueux émulsionnés hydrosolubles et les excipients hydrophobes. C'est un excipient hydrolipophile d'innocuité parfaite, très stable et quasi inaltérable, s'il est conservé sous azote.

Son pouvoir adjuvant de l'immunité serait étroitement lié à la solubilisation des éléments aussi bien hydrosolubles que liposolubles de l'antigène, en particulier les endotoxines glucido-lipido-protéiques dans lesquelles le polyoside protéine est un immunogène spécifique et le lipoïde A à la fois toxique et adjuvant de l'immunité (92).

CHAPITRE I

TOXICOLOGIE

Pour avoir quelque intérêt pratique, un excipient doit être, bien entendu, dépourvu de toute toxicité. L'étude toxicologique du Labrafil a fait l'objet de la thèse de VALETTE (89) ; nous nous limiterons à en rapporter les conclusions.

1) Toxicité primaire

1° Toxicité aiguë :

Des injections à dose massive (20 à 30 cm³) de Labrafil par la voie intra-péritonéale, intra-musculaire ou sous-cutanée à des cobayes n'ont entraîné aucun trouble ni aucune lésion au point d'inoculation ou à distance.

Les injections endo-veineuses à des chiens de l'excipient pur se sont montrées dangereuses. Suivant la dose (10 à 20 cm³), on observe une hypotension brutale, suivie d'une accélération cardiaque considérable et un affaiblissement de l'énergie des systoles. Ces animaux reprennent leur état normal en quelques minutes.

2° Toxicité chronique :

Des essais effectués sur 2 lots de 5 cobayes recevant quotidiennement 0,5 à 10 cm³ de Labrafil pendant 10 jours

de suite par la voie intra-musculaire ou sous-cutanée, n'ont permis de relever aucun effet toxique. Les animaux auxquels le produit était administré par la voie sous-cutanée présentaient des indurations de la peau, des adhérences du tégument aux plans sous-jacents. Les injections intra-musculaires déterminent de petits nodules indurés.

L'application de cet excipient sur des cornées de nombreuses espèces animales (chien, lapin, cobaye) ne provoque aucune inflammation, ni aucune irritation.

II) Toxicité secondaire

1° *Hypersensibilité immédiate de type anaphylactique :*

Un lot de 10 cobayes, espèce de choix pour l'étude, est sensibilisé par la voie sous-cutanée à la dose de 0,25 cm³ du produit pur ou dilué à 1 %. Ces animaux ont reçu, 20 jours plus tard, une injection déchaînante par la voie intracardiaque à la dose de 20 cm³ du produit pur ou dilué à 1 %. Le pourcentage de morts immédiates obtenu est comparable à celui des témoins non sensibilisés. Les signes développés lors du choc mortel ne sont pas superposables à ceux relevés au cours du choc anaphylactique. Le Labrafil ne semble donc pas être anaphylactisant, et les accidents relevés sont dus à un choc primaire lié à la nature physico-chimique du produit.

2° *Hypersensibilité retardée :*

Dans les mêmes conditions, des cobayes ont reçu une injection primaire de 0,5 cm³ par la voie sous-cutanée, puis une seconde injection 20 jours plus tard dans le derme du dos. Après épilation et lecture, une troisième injection de 1 cm³ par la voie intra-péritonéale a été réalisée. Une réaction inflammatoire s'est développée dans les mêmes conditions que chez les témoins. De même, les réactions péritonéales et générales furent identiques chez les animaux sensibilisés et les témoins.

Il ne semble donc pas que le Labrafil soit doué de propriétés allergisantes mais seulement de propriétés inflammatoires locales d'ailleurs très faibles.

La toxicité du Labrafil a été étudiée également sur 5 générations successives de souris blanches. Aucun effet toxique n'a été observé.

Le Labrafil n'a aucun pouvoir hémolytique sur les hématies de souris, de cobaye, de lapin, de chien et de chèvre.

III) Tests tératogènes

Le Labrafil a subi des tests qui signalent chez l'animal l'absence de toute toxicité d'ordre tératogénique.

CHAPITRE II

ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES DU LABRAFIL

I) Diffusion

Le pouvoir adjuvant de l'immunité d'un excipient vaccinal est lié en grande partie à une meilleure présentation des immunogènes au niveau des récepteurs cellulaires et une dispersion maximale des molécules antigéniques. Par son action détersive, l'huile Labrafil réaliserait une absorption solide des antigènes sur la cellule et faciliterait leur pénétration.

La mesure de la vitesse de diffusion du Labrafil est difficile puisqu'il est dépourvu d'action physiologique propre ou de caractéristiques permettant un dosage tissulaire ou humoral précis. C'est pourquoi il a été nécessaire de lui incorporer une substance témoin, un « traceur », facile à détecter. L'étude de la diffusion a fait l'objet de nombreuses expériences au service de physiologie (10) ; nous nous limitons à résumer très succinctement les résultats obtenus.

Par la voie cutanée ou intra-musculaire, l'effet pharmacodynamique du « traceur » ésérine incorporée dans le

Labrafil est plus précoce et surtout plus intense que lorsqu'il est inclu dans l'huile ordinaire.

L'application au niveau de la conjonctive de l'ésérine dans du Labrafil montre que la résorption de l'excipient est rapide et la pénétration de l'ésérine est plus grande que lorsqu'elle est utilisée dans l'huile d'olive. Des observations analogues ont été faites par la voie cutanée.

II) Effet retard

Les procédés retards visent à modifier certaines propriétés de l'organisme : diffusion, élimination, inactivation ; ou bien, et c'est la quasi totalité des cas, s'obtiennent en modifiant soit le véhicule, soit le principe actif (17). La diffusion rapide de l'excipient vaccinal permet une stimulation précoce par les antigènes ; par contre, l'effet retard prolonge cet état de stimulation. L'étalement de l'effet stimulant est lié à une meilleure captation des antigènes par l'organisme. La persistance de l'état d'immunité, écrit JACOTOR, « n'est pas obligatoirement liée à la présence de l'antigène dans le granulome d'inoculation » (39) ; mais on admet classiquement qu'elle est due à sa persistance dans l'organisme. C'est pourquoi il est nécessaire de déterminer l'importance de l'excipient dans le ralentissement de l'élimination des immunogènes (100).

L'effet retard du Labrafil a fait l'objet de la thèse de SERVANTON. Les « traceurs » utilisés sont des antibiotiques. Nous nous limitons à en rapporter très brièvement les conclusions.

Les antibiotiques administrés par la voie intra-musculaire dans de l'eau distillée présentent une courbe sérique en dôme aigu avec apparition et disparition précoces et un taux d'antibiotique élevé pendant une courte période. Les antibiotiques administrés en huile d'olive ou en excipient Labrafil présentent au contraire une courbe en dôme étalé, avec apparition et disparition retardées et un taux d'antibiotique relativement bas, mais réparti selon une période plus prolongée.

Les courbes d'élimination urinaire de la terramycine (antibiotique non hydrosoluble, indosable dans le sérum sanguin, dosable dans l'urine) permettent d'observer les mêmes faits :

— l'antibiotique administré par la voie intra-musculaire en eau distillée, apparaît plus précocement dans l'urine et à des taux plus élevés pendant trois jours ; le taux d'élimination diminue ensuite beaucoup ;

— l'antibiotique administré en solution huileuse ou dans du Labrafil, est éliminé plus tardivement, à un taux plus bas, mais l'élimination se maintient à un taux moyen plus tardivement (44).

Il s'agit dans les deux cas d'un effet retard classique.

III) Effet stimulateur sur les cultures microbiennes

Le choix d'un excipient vaccinal doit tenir compte de ses effets sur l'antigène et, en tout premier lieu, de son action bactériostatique.

Des expériences ont été réalisées aussi bien in vitro que sur embryon de poulet de 10 jours, vis-à-vis soit de souches de collection de staphylococcus aureus, escherichia coli, streptocoques animal pyogènes, soit de deux souches de bacilles acido-résistants : *Mycobacterium tuberculosis*, type humain virulent et streptomycinosensible, et *Mycobacterium chelonae* avirulent résistant à la streptomycine, capable de se multiplier sur les tissus embryonnaires sans y apporter de lésions spécifiques.

On peut retrouver tout le protocole de l'expérimentation dans la thèse de SERVANTON J. Nous nous limiterons à mentionner quelques conclusions :

— In vitro, sur les bactéries banales, aucun pouvoir bactériostatique n'a été révélé. Sur les mycobactéries, un pouvoir inhibiteur régulier mais faible a été constaté.

— In vivo, *M. chelonae* avirulent pour l'embryon mais s'y multipliant très abondamment a semblé avoir été freiné par le Labrafil utilisé comme excipient. Il en est de même pour *M. hominis*.

CHAPITRE III

EFFET PHLOGOGENE

La diffusion rapide et l'effet retard du Labrafil sont liés à ses propriétés physico-chimiques. Mais on peut supposer qu'il agit par modification du terrain, en particulier du S.R.E. (46).

Pour infirmer ou confirmer cette hypothèse, l'expérience suivante a été réalisée avec la collaboration de M. TOMMASI.

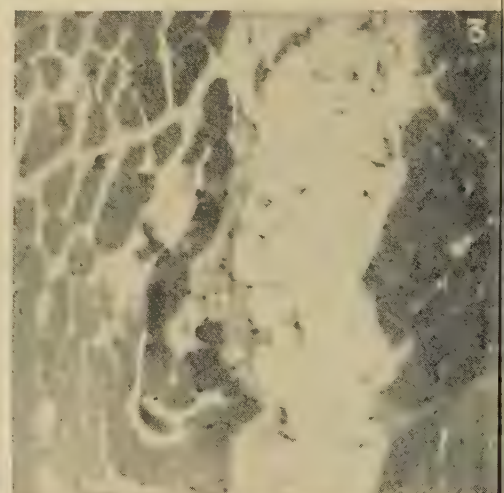
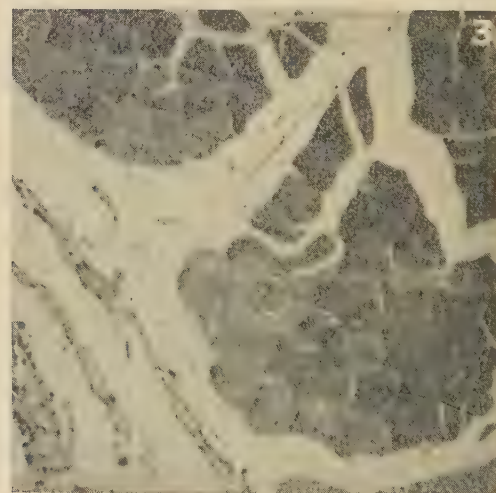
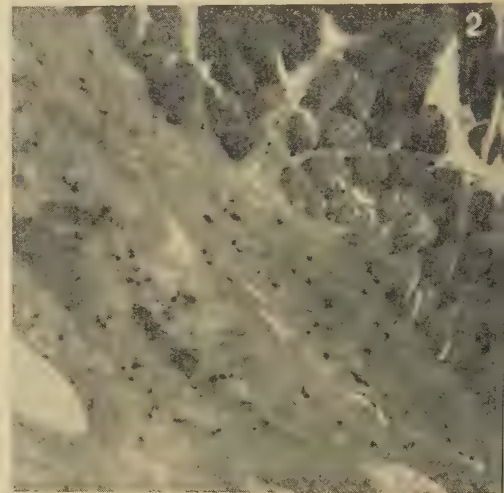
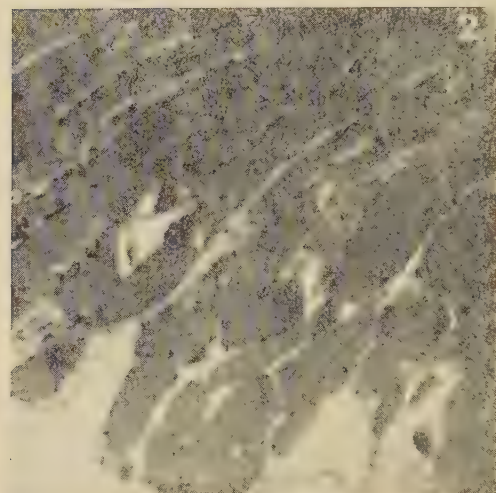
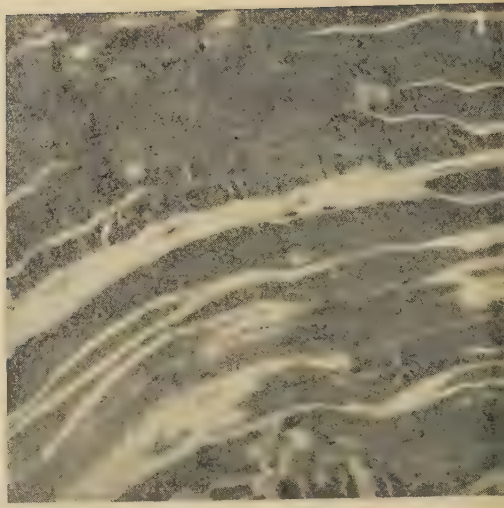
1) Matériel et méthode

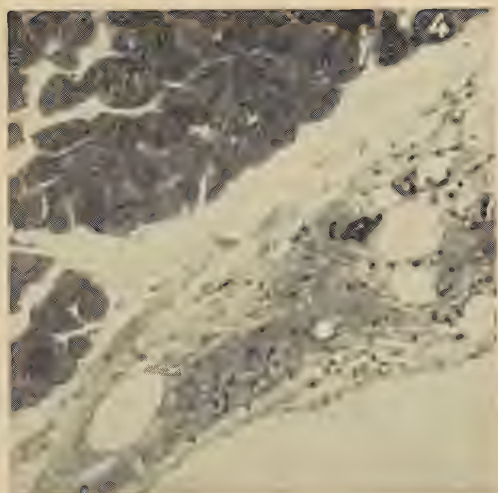
Le Labrafil est administré par injection intra-musculaire profonde dans le triangle de Scarpa à des cobayes sains de 350 grammes, à la dose de 0,5 à 1 ml.

Les cobayes, séparés en 7 lots, subissent au temps les injections. Le point d'injection est aussitôt repéré par du bleu de toluidine. Les animaux sont sacrifiés par défonce-ment de la boîte crânienne aux temps connus, mentionnés dans le tableau ci-après. Les muscles adducteurs droits et gauches de chaque animal sont prélevés et conservés dans du liquide de Bouin, puis déshydratés avant leur inclusion en paraffine.

Des coupes histologiques sont alors effectuées à divers niveaux des fragments musculaires, qui sont colorés ensuite par la méthode trichromique à l'hémalun-phloxine-safran, avec traitement des graisses par solvant type toluène.

Les examens microscopiques de ces coupes permettent de dresser le tableau analytique suivant :





Co- beyes lot n°	Temps de latence avant sacrifice de l'animal	Muscle inoculé d'huile d'olive Codex	Muscle inoculé de Labrafil
1	20 minutes	Dissociation traumatique des faisceaux musculaires due à l'injection.	Dissociation traumatique des faisceaux musculaires due à l'injection.
2	3 heures	Dissociation traumatique.	Dissociation traumatique.
3	12 heures	Apparition en des points très limités, de petites plages d'exsudation leucocytaire dans le tissu interstitiel, au voisinage des points d'injection.	Dissociation traumatique.
4	24 heures	Légère exsudation leucocytaire.	Apparition très discrète, non spécifique, de petites trainées d'exsudation fibrino-leucocytaire au contact des espaces intestitiels où semble avoir fusé le produit.
5	48 heures	Plus vastes plages inflammatoires. Le tissu conjonctif interstitiel dissocié est infiltré de leucocytes à dominantes polynucléaires s'insinuant entre les fibres musculaires voisines. Quelques figures de stéatonécrose de la graisse inter-fasciculaire et quelques aspects dégénératifs des fibres musculaires immédiatement voisines. Pas de figure de macrophagie. Exsudation inflammatoire banale.	Aspect absolument superposable à celui décrit ci-contre.
6	6 jours	Muscle redevenu normal sans séquelles.	Muscle redevenu normal avec petits infiltrats histocytaires lipophagiques sous - péri-mysiaux.
7	7 jours	Aspect strictement analogue.	Muscle redevenu normal sans sclérose ni altération histologique.

II) Conclusion

Le Labrafil semble déterminer une réaction inflammatoire discrète à partir de la 24^e heure. Cette réaction est maximale à la 48^e heure.

Cette réaction a un aspect très banal, un caractère peu prononcé, ne prend jamais le type de granulome à corps étranger. Elle ne laisse pratiquement aucune séquelle histologique visible après 6 et 7 jours.

CONCLUSIONS

L'huile Labrafil est un glycéride interestérifié possédant des propriétés physico-chimiques très caractéristiques, à savoir :

— Absence de toxicité et de pouvoir de stimulation des cultures microbiennes.

— Stabilité quasi inaltérable et très grande résistance à la peroxydation.

— Diffusion rapide doublée d'un effet retard bien net.

— Solubilisation des substances hydrosolubles et liposolubles.

— Pouvoir phlogogène très réduit.

Toutes ces propriétés l'ont fait choisir comme un excellent excipient d'antibiotiques et d'hormones et dermatologie et en cosmétologie, et comme support aux solutés huileux injectables et buvables (hormones, vitamines liposolubles...). Ce sont ces mêmes propriétés qui nous ont incité, en l'utilisant comme excipient vaccinal, à étudier son pouvoir adjuvant et stimulant de l'immunité.

CHAPITRE IV

POUVOIR ADJUVANT ET STIMULANT DE L'IMMUNITÉ DU LABRAFIL

Nous avons cherché les propriétés adjuvantes et stimulantes de l'immunité du Labrafil vis-à-vis des antigènes tissulaires et des antigènes anti-endotoxiques et antibactériens. L'évaluation de l'immunisation antitissulaire est réalisée par des méthodes sérologiques. La protection anti-endotoxique et antimicrobienne est appréciée par des méthodes immunologiques.

I. — SERO-STIMULATION ANTITISSULAIRE

I) Principe

Nous avons cherché le pouvoir adjuvant du Labrafil en injectant à des chèvres des hématies humaines des groupes A et B additionnées ou non de Labrafil.

II) Matériel

1. Le sang : Le jour des injections, nous recevons deux flacons contenant chacun 40 cc de sang stérile dilué dans de l'eau physiologique et portant une étiquette indiquant le groupe A ou B. Ces flacons sont conservés dans une armoire frigorifique à 4° C jusqu'au moment des injections.

2. Les animaux : Dans une même pièce, 4 chèvres à peu près de même poids, marquées A1, A2, B1, B2, sont réparties chacune dans un box à part et reçoivent une alimentation identique.
3. L'adjuvant et autres matériels : Un flacon d'huile Labrafil est conservé pendant toute l'expérimentation à la température du laboratoire.

Les seringues, les aiguilles et les trocarts sont stérilisés avant leur utilisation.

Une boîte de Phénergan en ampoules de 10 cc, ainsi que de l'huile éthérée-camphrée étaient à notre disposition pour prévenir les chocs graves.

III) Méthode

Les chèvres A reçoivent les hématies lavées et diluées du groupe A par voie endoveineuse dans la jugulaire ; dans les mêmes conditions, les chèvres B reçoivent les hématies du groupe B.

Les témoins A1 et B1 sont inoculés chacun avec 20 cc de sang ; à A2 et B2, nous injectons 19 cc de sang additionné de 1 cc de Labrafil au moment de l'administration.

Les injections ont lieu une semaine sur deux ; les animaux sont chargés trois fois par semaine : le lundi, le mercredi, le vendredi.

Un prélèvement d'essai est effectué sur les quatre chèvres à la 7^e semaine, avant l'injection du mercredi.

Les chèvres A1 et A2 sont saignées à la 8^e semaine ; 300 cc de sang, prélevé stérilement, servent au titrage des anticorps.

Les chèvres B1 et B2 ne sont saignées que deux semaines plus tard parce que le pouvoir immunogène de l'antigène B est plus faible que l'antigène A.

IV) Titrage d'essai

Les titrages effectués sur les prélèvements d'essai ont montré que le taux d'anticorps anti-A et anti-B restait faible.

Pour éviter les chocs qui devenaient de plus en plus brutaux, nous avons dilué de nouveau le sang à injecter au

1
— dans de l'eau physiologique ; en même temps, nous
20
injectons 2 cc d'adjuvant de Freund par animal pour activer la synthèse des anticorps.

Les titrages suivants n'ont pas montré une augmentation notable du taux d'anticorps.

V) Résultats

1. Le sérum des chèvres immunisées avec des hématies humaines des groupes A et B lavées et diluées dans du sérum physiologique, additionnées de Labrafil, contient un taux d'anticorps aussi faible que le sérum des animaux témoins ayant reçu les hématies dans les mêmes conditions mais sans Labrafil.
2. L'injection simultanée de l'adjuvant de Freund ne produit aucune élévation sensible des anticorps anti-A et B. Ceci peut s'expliquer par le fait que les animaux ont reçu des quantités d'antigène telles que l'état d'inhibition réalisé n'a pu être levé par stimulation du système réticulo-endothélial avec l'adjuvant de Freund (62, 94).
3. Les animaux qui reçoivent le Labrafil présentent des chocs de types anaphylactiques bien plus brutaux que les témoins, à partir de la 3^e semaine. Le Labrafil semble agir en augmentant la sensibilité de l'organisme vis-à-vis des immunogènes.

4. A l'autopsie, ces animaux ne présentent ni dégénérescence amyloïde, hépatique ou splénique, ni hypertrophie des ganglions, ni tout autre signe macroscopique évoquant une grande activité de synthèse des anticorps.
5. Une expérimentation analogue réalisée par M. CARRAZ (15) sur le mouton avec des hématies humaines additionnées d'adjuvant de Freund, a abouti également aux mêmes conclusions. Des expériences complémentaires pour contrôler ces résultats et élucider ce problème sont souhaitables.

Sans doute, la réponse immunitaire à l'antigène sans adjuvant est-elle déjà maximale. L'addition d'adjuvant entraîne un phénomène de zone par excès et fait entrer dans le domaine de l'allergie ou de l'anaphylaxie.

SERO-STIMULATION ANTIBACTERIENNE

I) Matériel et méthode

a) *Vaccin T.A.B. de l'Institut Pasteur.*

Nous avons constitué un lot homogène de vaccin T.A.B. de l'Institut Pasteur, au total 400 millilitres de vaccin T.A.B. dont la suspension stérile est soigneusement agitée avant de réaliser les réactifs d'immunisation.

Ce vaccin T.A.B. contient par millilitre :

750 millions d'Eberthella Typhi ;
250 millions de Salmonella Para-Typhi A ;
500 millions de Salmonella Para-Typhi B.

Ce vaccin, qui est une suspension de tous ces germes en Soluté de Chlorure de Sodium à 8,5 ‰, est stérilisé.

Sa stérilité est réalisée par chauffage à 56°. Ce vaccin ne contient pas d'antiseptique.

Les 250 millilitres de vaccin T.A.B. homogénéisé stérile sont divisés stérilement en 2 lots de 114 millilitres. Ces 2 lots sont répartis en 2 flacons stériles.

— Lot I. — La suspension vaccinale est additionnée de 6 millilitres de Chlorure de Sodium à 8,5 ‰.

— Lot II. — La suspension vaccinale est additionnée de 6 millilitres de Labrafil M 1944 C stérile.

Les émulsions de ces deux suspensions sont soigneusement homogénéisées et réparties en flacons stériles, type Pénicilline, de façon à être utilisés régulièrement tout au cours de l'immunisation.

La conservation est assurée par séjour au réfrigérateur à + 4°. Avant tout prélèvement, les suspensions sont soigneusement homogénéisées par agitation et au préalable mises à température ordinaire.

b) *Animaux d'expérience.*

Les animaux d'expérience sont 8 lapins mâles dont les poids au départ sont les suivants :

Lot I. — Lapin n° 279 = 1 kg 730.

Lapin n° 288 = 1 kg 890.

Lapin n° 287 = 1 kg 800.

Lapin n° 278 = 1 kg 520.

Lot II. — Lapin n° 289 = 1 kg 890.

Lapin n° 282 = 1 kg 520.

Lapin n° 283 = 1 kg 800.

Lapin n° 277 = 1 kg 540.

c) *Méthodes d'immunisation et récolte des prélèvements.*

— JOUR 0 : *Prélèvement A* : Un prélèvement est effectué pour vérifier la teneur en anti-corps naturel.

— JOUR 1 : Inoculation par voie intra-musculaire à la face supérieure de la cuisse, de l'émulsion vaccinale 2 ml.

— JOUR 2 : Inoculation par voie intra-musculaire à la face supérieure de la cuisse : 2 ml.

— JOUR 3 : Inoculation par voie intra-musculaire à la face supérieure de la cuisse : 4 ml.

— JOUR 12 : *Prélèvement B* : pour Sérologie.

— JOUR 14 : *Prélèvement C* : a) pour Sérologie ;

b) inoculation de rappel de 2 ml d'émulsion.

- JOUR 15 : Inoculation de rappel de 4 ml d'émulsion.
- JOUR 17 : *Prélèvement D.*
- JOUR 19 : *Prélèvement E.*
- JOUR 21 : *Prélèvement F.*
- JOUR 24 : *Prélèvement G.*
- JOUR 26 : *Prélèvement H.*
- JOUR 28 : *Prélèvement I.*
- JOUR 31 : *Prélèvement J.*

d) *Réalisation de l'agglutination.*

L'agglutination est réalisée en tubes suivant les techniques habituelles de la Sérologie typique avec des émulsions standards de l'Institut Pasteur :

BO — BH

TO — TH

AO — AH

CO — CH

Les dilutions des sérums des prélèvements se font par passage en eau physiologique.

e) *Nombre d'animaux utilisés dans chaque lot.*

4 animaux ont été utilisés dans chaque lot :

LOT I : 279, 288, 287, 278.

LOT II : 289, 282, 283, 277.

Dans chaque lot, chaque animal reçoit le même mélange, le même rythme d'injection, et subit le même prélèvement.

II) **Les résultats**

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants. L'analyse de ces résultats permet de conclure que :

1° Le sérum des animaux vaccinés avec le vaccin

T.A.B. de l'Institut Pasteur additionné de Labrafil présente des taux d'anticorps agglutinants supérieurs à ceux des animaux témoins ayant reçu le même vaccin dans de l'eau physiologique.

2° Cette stimulation est particulièrement nette sur les anticorps anti-H, ce qui laisse supposer que le Labrafil est plus hydrophile que lipophile, puisqu'il solubilise mieux les antigènes des cils.

3° L'effet du Labrafil s'exerce sur la précocité de l'apparition des anticorps ; son effet sur la prolongation de l'immunité anti-T.A.B. n'a pas été examiné.

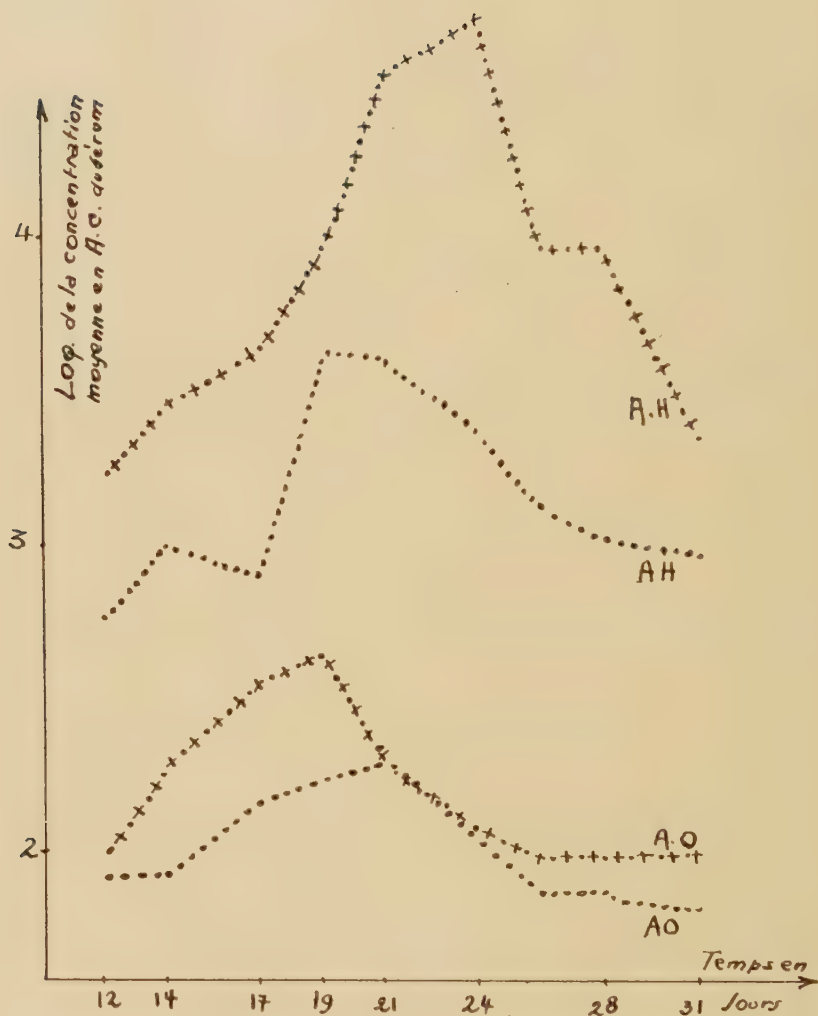
4° L'apparition d'anticorps anti-O et H de paratyphi C est dû à la communauté antigénique existante entre C et T.A.B.

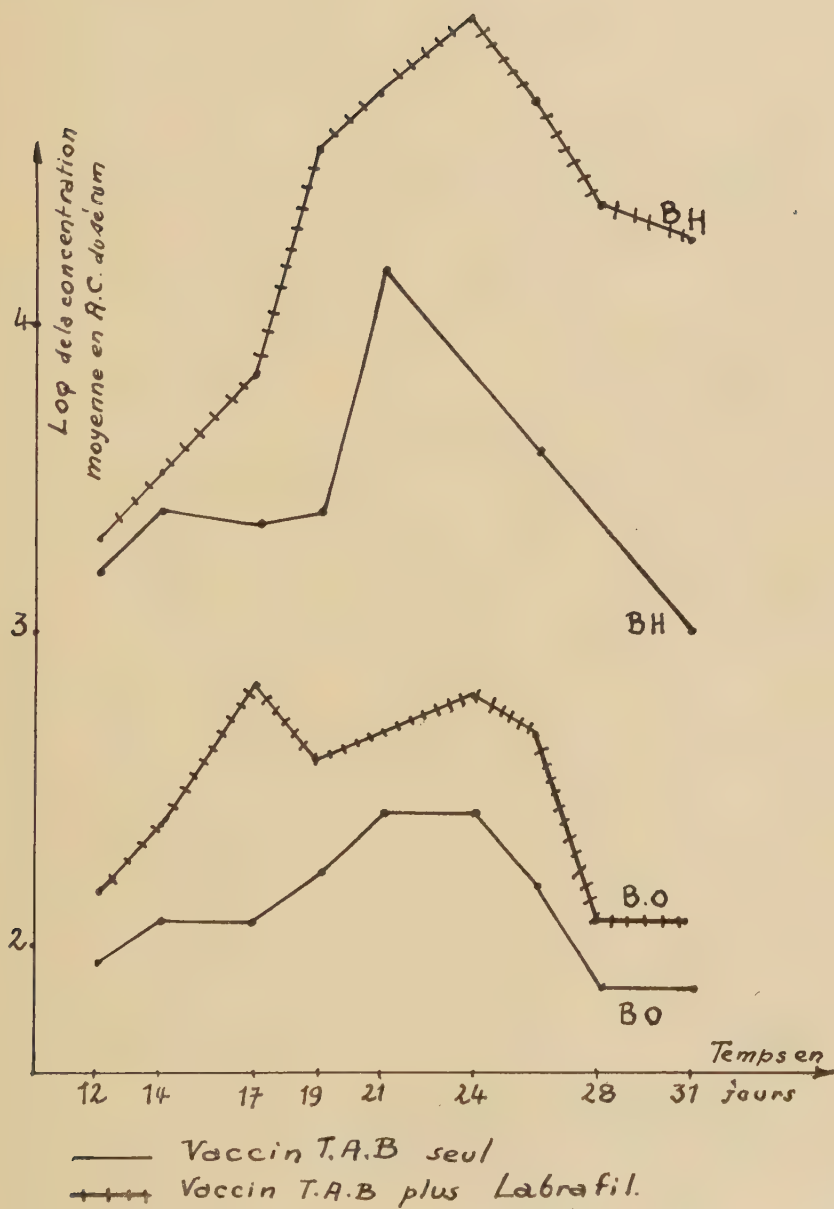
Taux moyen en anticorps agglutinants des sérums des lapins immunisés avec le vaccin T.A.B. sans Labrafil

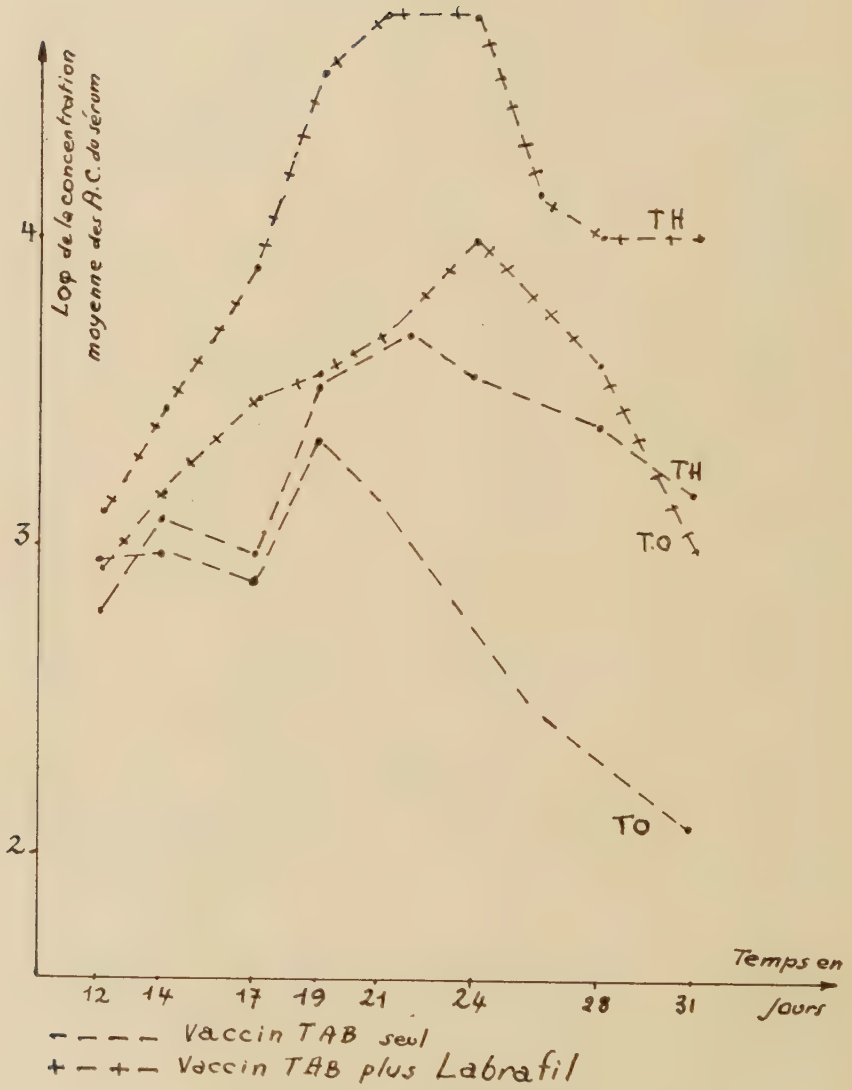
Jour	0	12	14	17	19	21	24	26	28	31
Prélèvement	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
T O	0	900	950	750	2 200	1 400	750	300	200	125
T H	0	600	1 250	950	3 300	4 800	3 600		2 400	1 500
A O	0	87,5	87,5	150	175	200		75	75	68,87
A H	0	600	1 000	800	4 250	4 025	2 425	1 325	1 050	950
B O	0	88	125	125	175	275		162,5	75	75
B H	0	1 600	2 500	2 300	9 900	15 250	275	4 050		1 050

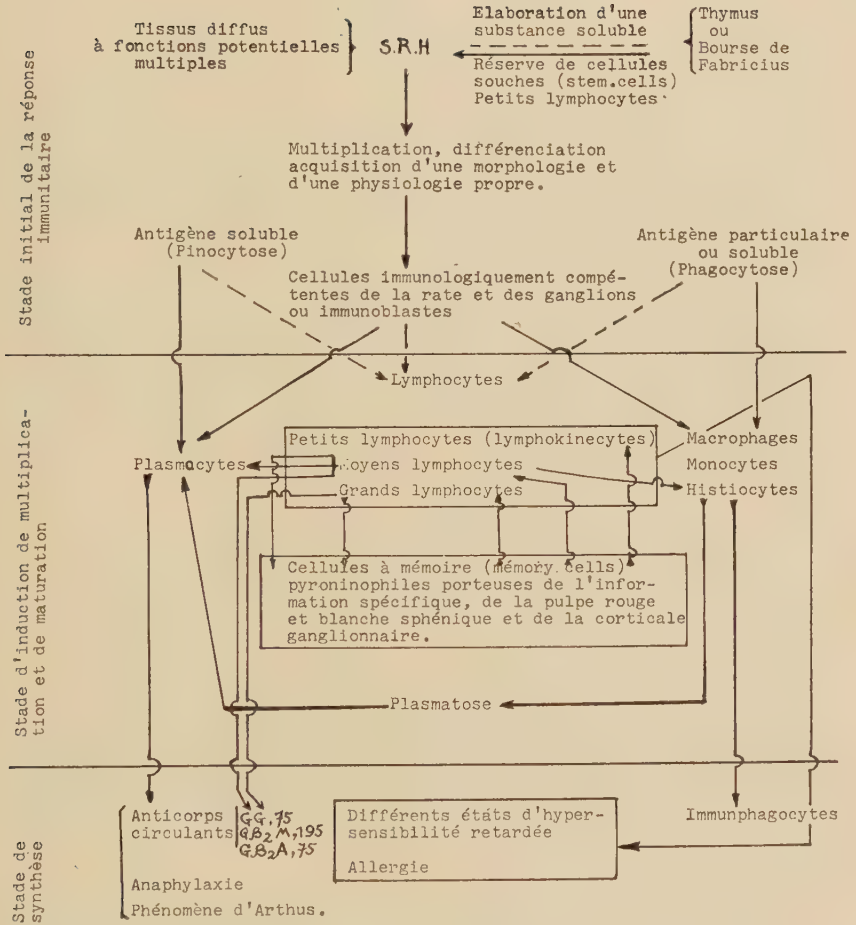
Taux moyen en anticorps agglutinants des sérums des lapins immunisés avec le vaccin T.A.B. additionné de Labrafil.

T O	0	850	1 500	3 000	3 600	4 800	10 200		3 900	1 150
T H	0	300	2 800	8 000	33 600	52 800	52 400	14 000	10 850	10 800
A O	0	100	200	375	450	200	125	100	160	100
A H	0	1 800	3 000	4 400	9 600	34 300	58 800	9 200	9 200	2 225
B O	0	150	250	700	400	500	650	500	125	125
B H	0	2 000	3 400	7 375	38 250	57 600	102 400	54 400	25 600	19 200









II. — IMMUNOSTIMULATION ANTI-ENDOTOXIQUE ET ANTIBACTERIENNE

I. — Matériel

1) Vaccins

A) *Anticolibacillaire*. — Deux souches d'*Escherichia coli* de forme S (Smooth), antigéniquement différentes ($O_8 H_9$; $O_4 H_{45}$), isolées d'enzooties colibacillaires du porc, ont été cultivées sur gélose ordinaire en boîte de Roux. L'extraction de l'endotoxine a été effectuée par la technique de Boivin à l'acide trichloracétique N/2, ou par lyse des germes par la soude (15 mmgr de culture de 24 h. à pH 12, 1 heure de contact à 37°, puis réajustement du pH à 7 et dilution en eau physiologique en quantité suffisante pour obtenir 15 ml).

L'endotoxine additionnée :

— soit de Labrafil à concentration de 5 % ;

— soit d'hydroxyde d'aluminium à la concentration de 5 %,

constitue les deux vaccins anti-endotoxiques utilisés.

Les témoins furent constitués par de l'eau physiologique additionnée de Labrafil ou d'hydroxyde d'aluminium.

Les injections sont réalisées par la voie intra-musculaire à la dose de 0,5 ml.

B) *Antirouget*. — Une souche virulente et hémagglutinante d'*Erysipelotrix insidiosa* a été cultivée en bouillon glucosé à 1 % en boîte de Roux. Les bacilles obtenus par centrifugation ont été :

— soit traités par la chaleur à 60° C pendant 30 minutes, puis additionnés ou non de 5 % de Labrafil ;

— soit traités pendant 15 jours à + 10° C par le chrome, à la dose de 100 mmgr par litre de culture de chromate acide de potassium, additionnée ou non de 5 % de Labrafil ou de 10 % d'extrait tissulaire, pour obtenir des suspensions microbiennes de 1 milliard de germes par ml.

Les témoins furent constitués par de l'eau physiologique additionnée ou non de 5 % de Labrafil ou de 10 % d'extrait tissulaire.

Les injections sont réalisées par la voie sous-cutanée à la dose de 0,5 ml.

2) Bactéries virulentes d'épreuve

Les cultures des différents germes ayant servi à la préparation des vaccins ont été utilisées comme épreuve chez les animaux vaccinés, par rapport aux témoins neufs. La DL 50 de ces germes était respectivement (sur 30 animaux) :

E. Coli : 10-2,5 d'une culture en bouillon de 24 heures.

E. Insidiosa : 10-4,2 au 4^e jour, d'une culture au bouillon glucosé de 24 heures.

Les inoculations ont été effectuées par la voie intrapéritonéale à la dose de 0,5 ml. Une tentative de calcul d'une DL 50 par la voie intradermique sur la peau du dos du hamster et de la souris a conduit à un échec.

3) Animaux

Le hamster et la souris blanche ont été respectivement utilisés pour l'expérience de la vaccination anticolibacillaire et pour l'expérience de la vaccination anti-rouget. Les résultats obtenus chez le hamster sont aberrants en raison de la sensibilité profonde de cette espèce à la période hivernale.

4) Indice d'immunité

Le degré de l'immunité conférée a été évalué par un indice d'immunité sous forme de rapport :

$$I = \frac{\text{DL 50 témoins}}{\text{DL 50 vaccinés}}$$

La DL 50 des animaux vaccinés ayant été établie sur les survivants de l'expérience.

II. — Méthode

L'immunisation et l'épreuve virulente se sont déroulées comme suit :

Jour 0 : vaccination initiale.

Jour 15 : revaccination.

Jour 30 : épreuve.

Les cadavres des animaux morts en expérience ont révélé régulièrement une septicémie due au germe en cause, sauf quelques accidents allergiques non microbiens signalés ci-dessous.

III. — Résultats

Ils sont résumés dans les deux tableaux ci-dessous. Leur lecture permet de tirer les déductions suivantes :

- 1° Les résultats paraissent interprétables puisqu'aucune mortalité étrangère à l'expérience n'est venue les perturber et que les indices immunitaires procurés par les injections témoins (eau physiologique + 5 % de Labrafil ou 5 % d'hydroxyde d'aluminium ou 10 % d'extrait tissulaire, eau chromée) sont voisins de 1 aux erreurs d'expérience près (différence non significative).

- 2° Les vaccinations et revaccinations d'immunogènes additionnés de Labrafil ont entraîné la mort d'un nombre assez important d'animaux : 7 hamsters, 6 souris et 5 souris, surtout par rapport à la mortalité nulle ou très faible des autres lots de l'expérience, à l'exception du vaccin antirouget chauffé et pur. Tout se passe comme si le Labrafil avait opéré une meilleure solubilisation des éléments lipoidiques des endotoxines et avait pleinement révélé les propriétés toxiques de ces substances en les dispersant au maximum.

Il serait donc nécessaire de diminuer la proportion des immunogènes actifs dans les vaccins additionnés de Labrafil, sous peine d'accidents de vaccination primaire.

Ces constatations corroborent celles de JONQUIÈRES et Coll. (41) qui avaient décrit une activité supérieure de l'acide salicylique sur la peau lorsque le produit était incorporé au Labrafil. De plus, elles apportent un supplément de preuve indirecte que la fraction toxique est bien de nature lipoidique (composant T de Goebel, lipoïde A de Westphal) et aussi que ce lipoïde, bien que non antigénique par lui-même, est un adjuvant non spécifique de l'immunité selon POWLEY, WESTPHAL et HAMMER (92).

- 3° Dans la vaccination antirouget, la revaccination détermine, en quelques heures, des accidents allergiques brutaux dus, vraisemblablement, à une sensibilisation accrue de l'organisme aux antigènes spécifiques. Nous avons déjà signalé les rapports étroits qui existent entre l'allergie et l'immunité dans la vaccination antirouget ; ces accidents brutaux seraient dus à une meilleure captation par l'organisme des allergènes en Labrafil et corroborent les résultats obtenus dans l'immunité.

4° La confrontation des indices d'immunité souligne, aux erreurs statistiques près, la qualité des vaccins additionnés de Labrafil (2,5 pour le vaccin anticolibacillaire, 1,6 pour le vaccin chauffé et 2,3 pour le vaccin chromé antirouget) vis-à-vis des vaccins :

— soit additionnés d'hydroxyde d'aluminium (1,25 pour le vaccin anticolibacillaire) ;

— soit additionnés d'extrait tissulaire (1,6 pour le vaccin antirouget chromé).

Ces propriétés pro-immunitaires s'expliquent en partie par une solubilisation plus complète et une meilleure dispersion des immunogènes, à la fois hydrosolubles et liposolubles. Elles résultent aussi d'une stimulation réticulo-endothéliale objectivée par la réaction granulomateuse transitoire, au lieu d'injection, et la non séquestration des immunogènes ; ceci se traduit également par un effet retard dû au ralentissement de l'élimination des immunogènes.

La pratique des vaccins « Labrafilés » (auto-vaccins d'exploitations contre la pasteurellose et la colibacillose du porc, contre les mammites bovines) est en accord avec ces résultats expérimentaux.

5° Une expérience de contrôle, effectuée 4 mois plus tard, a montré une conservation supérieure des immunogènes inclus en Labrafil (indice immunitaire inchangé) par rapport à ceux inclus dans les autres excipients.

I. — Vaccin anticolléculaire

Vaccin sur hamsters	Effets (Nombre de morts)	Vacci- nation initiale (Jour 0)	Suites (Jours 1 à 15)	Revacci- nation (Jour 15)	Suites (Jour 15 à 30)	Epreuve DL 50 (Jour 30)	Indice d'immu- nité
Lysat pur (30 animaux)		0	0	0	1	10 ^{-2,2}	1,01
Lysat + 5 % Labrafil (30 animaux)		0	5 du 2 ^e au 5 ^e jour	0	2	10 ⁻¹	2,5
Lysat + 5 % Hyd. Al. (30 animaux)		0	1	0	1	10 ⁻²	1,25
Eau + 5 % Labrafil (5 animaux)		0	0	0	0	10 ^{-2,6}	0,9
Eau + 5 % Hyd. Al. (5 animaux)		0	0	0	0	10 ^{-2,4}	1,004
Témoins (30 animaux)						10 ^{-2,5}	1

II. — Vaccin anti-Rouget

Vaccin sur Souris	Effets (Nombre de morts)	Vaccination initiale (Jour 0)	Suites (Jours 1 à 15)	Revaccination (Jour 15)	Suites (Jours 16 à 30)	Epreuve DL 50 au 4 ^e jour (Jour 30)	Indice d'immunité
Vaccin chauffé pour 20 animaux		0	3	0	3	10 ^{-3,2}	1,3
Vaccin chauffé + 5 % Labrafil (20 animaux)		0	3	0	3	10 ^{-2,6}	1,6
Vaccin chromé (20 animaux)		0	0	0	1	10 ^{-2,9}	1,4
Vaccin chromé + 5 % Labrafil (20 animaux)		0	3	0	2	10 ^{-1,8}	2,3
Vaccin chromé + 10 % E.T. (20 animaux)		0	1	0	0	10 ^{-2,5}	1,6
Eau chromée (5 animaux)		0	1	0	0	10 ⁻⁴	1,05
Témoins							
Eau + 5 % Labrafil (5 animaux)		0	0	0	0	10 ^{-4,3}	0,9
Eau + 10 % E.T. (5 animaux)		0	0	0	0	10 ⁻⁴	1,05
Témoins (20 animaux)						10 ^{-4,2}	1

CHAPITRE V

COMPARAISON DE TROIS EXCIPIENTS DONT UNE HUILE INTERESTERIFIEE SUR LA PROTECTION PROCUREE PAR DEUX VACCINS ANTIBRUCELLIQUES INACTIVES

Le programme d'éradication de la brucellose, maladie de contagement subtile, débute par une prophylaxie médicale dans les pays fortement infectés ou par une prophylaxie associée médico-sanitaire. Dans ces deux cas, la prémunition est réalisée, dans la plupart des pays, par un virus vaccinal atténué ayant un pouvoir agglutinogène chez l'animal jeune et chez l'adulte, d'innocuité très relative, d'efficacité limitée, onéreux et de conservation difficile. A mesure que la prophylaxie progresse, il est normal qu'on soit tenté d'utiliser un vaccin plus compatible avec l'établissement d'une prophylaxie sanitaire. C'est pourquoi la mise au point d'un vaccin *inactivé* n'ayant pas les inconvénients du B₁₉ devient nécessaire, et c'est là où le choix de l'adjuvant devient primordial.

Dans cette expérimentation, la comparaison de l'efficacité de quatre vaccins antibrucelliques inclus dans des excipients différents a été réalisée sur des animaux de laboratoire. Le protocole expérimental est à peu près le

même que celui qui a été suivi dans les expériences avec le vaccin antirouget. Le degré d'immunité est apprécié par l'épreuve virulente post-vaccinale et la numération des organes infectés.

1) Matériel et méthodes

— *Animaux de laboratoire* : Les essais doivent être effectués sur des lots aussi homogènes que possible. Des *cobayes* blancs de lignée « K », pesant 400 g environ, du même âge, et des *souris* R.A.P. de 18 g sont employés. Ces animaux reçoivent une nourriture sèche, homogène, dépourvue d'antibiotiques. Ils sont entretenus dans un local isolé, à une température (20°) et une humidité relative (50 %) maintenues constantes.

— *Souches d'épreuve* : La souche de *Brucella abortus* 544, distribuée par le Laboratoire de Weybridge est employée. Sa dose infectante, 50 %, est préalablement déterminée. Lors de chaque expérience, elle est vérifiée et se montre très stable : environ 2.000 germes par souris et 250 par cobaye.

La voie d'inoculation est péritonéale sous un volume de 0,2 ml pour la souris et de 1 ml pour le cobaye.

Des cultures sont obtenues sur Gélose Trypticase (B.B.L.), après 48 heures, et sont récoltées en eau salée à 8,5 ‰, étalonnées au photomètre. Une numération sur gélose est effectuée simultanément.

— *Vaccins* : Les vaccins à base de germes tués par le formol ont été préparés :

— à partir de la souche rugueuse Mac Ewen 45/20, soit en excipient huileux spécial, soit en Mayoline-Arlacel ;

— à partir de la souche rugueuse du Professeur Meyn ;

— à partir de la souche du Br. Melitensis H. 38 du Professeur Renoux, soit en excipient huileux spécial, soit en Mayoline ;

— une association vaccinale comprenant la souche 45/20 formolée et le vaccin anti-aphteux trivalent concentré, saponiné (5 ml).

La voie d'injection des vaccins est la voie sous-cutanée. Le caractère lisse et rugueux des souches est recherché par la méthode d'Henry, par le test au cristal violet, et par la stabilité en solution d'Acriflavine.

— *Durée des expériences* : L'épreuve a toujours lieu 6 semaines après l'immunisation, et le contrôle final : 6 semaines après l'épreuve.

— *Répartition des lots* : Chaque vaccin est inoculé à 40 animaux, et il faut 50 animaux de contrôle, afin de bien s'assurer de la dose infectante 50 %. Les vaccinés, groupés en lots de 10, reçoivent en moyenne 1, 10, 100 et 1.000 doses infectantes 50 %.

— *Autopsies* : Les animaux sont sacrifiés au chloroforme et trois prélèvements sont effectués : *rate, foie, rein*. Les prélèvements sont congelés immédiatement, puis broyés dans 2 fois leur poids d'eau salée à 8 ‰, etensemencée, à raison de 1/50 ml par organe.

Le nombre de germes par gramme de produit peut donc être évalué.

II) Résultats

1. *Essais quantitatifs.*

La présence d'une colonie de *Brucella* (identifiée par agglutination à l'aide d'un sérum monospécifique) dans une culture de prélèvement, fait classer celui-ci dans les positifs, et l'animal est compté comme infecté. La recherche de la Di-50 est alors effectuée suivant la méthode de Bonet-Maury.

Il a semblé que le fait de compter les organes infectés, plutôt que les animaux, donnait une image plus exacte de la réalité. Quant au nombre de germes par gramme d'organe, l'expérience nous a montré qu'il est fonction du temps qui sépare l'autopsie de l'infection, alors que le nombre d'organes infectés par animal ne variait guère après un délai d'un mois : il semble qu'il faille voir là la différence entre la multiplication septicémique des germes et la multiplication intracellulaire. Une expérimentation en cours sur ce sujet sera publiée.

L'excipient W.L., qui est une huile végétale transestérifiée, semble être supérieur dans ce domaine aux excipients huileux classiques : Mayoline 90 % (huile de paraffine légère) ; Arlancel 10 % (ou huile de paraffine 80 %) et Falba 20 %.

De plus, son avantage essentiel est sa facilité d'emploi. Alors que les excipients huileux ont une viscosité élevée, cet excipient est très maniable à la température ordinaire et ne laisse que de faibles réactions locales.

2. Résultats qualitatifs.

Les cobayes, comme les souris, donnent donc, dans la recherche de l'immunité antibrucellique, des résultats reproductibles. Le vaccin préparé à l'aide de la souche H 38 provoque, sous les deux formes d'excipients, une immunité qui semble supérieure à celle provoquée par l'autre vaccin.

L'excipient constitué par le vaccin aphteux est très inférieur aux deux autres, du point de vue adjuvant. La durée de l'immunité ainsi provoquée est un facteur important. Une expérimentation effectuée sur bovins, qui est en cours, donnera la réponse à cette question et permettra de choisir entre les deux excipients.

CONCLUSIONS

1° Parmi les nombreux facteurs aspécifiques de stimulation de la réaction immunitaire, les *adjuvants de l'immunité* présentent un intérêt tout particulier, et qui ne cesse d'augmenter depuis un demi-siècle. Sur le plan médical et vétérinaire, ils permettent l'obtention d'un meilleur rendement dans les vaccinations, tout en réduisant les dangers et les échecs. Sur le plan immunologique, ils constituent un excellent moyen d'étude du mécanisme de synthèse des anticorps et des différents états d'hypersensibilité.

2° Dans le cadre des théories actuelles sur la réaction immunitaire, nous avons tenté de donner une interprétation de leur *mode d'action*. Il faut retenir que l'antigène apporte la spécificité, et agit comme inducteur des cellules compétentes, marquant de son empreinte les ribonucléoprotéines et les désoxyribonucléoprotéines cellulaires qui transmettent cette information à leur descendance. Le mécanisme d'action des adjuvants reste à élucider ; mais il semble que les adjuvants agissent essentiellement sur la *multiplication et la maturation du système réticulo-endothélial*. Ainsi, la réaction locale à laquelle on accordait un intérêt primordial, et dont le rôle est d'ailleurs indiscutable pour certains adjuvants, n'est en fait, le plus souvent, que le témoin d'une stimulation générale de tout le système réticulo-endothélial.

3° Dans la partie expérimentale personnelle, nous avons d'abord cherché le pouvoir phlogogène d'une huile de noyaux interestérifiée (Labrafil). Celui-ci est pratiquement nul ; il ne persiste, au point d'inoculation, aucune lésion granulomateuse, ni aucune séquelle. L'étude du *pouvoir adjuvant de l'immunité antitissulaire* (hématis

humaines des groupes A et B) *anti-endotoxique et antibactérienne* du Labrafil montre que, dans la séro-stimulation antitissulaire, les résultats obtenus sont ininterprétables. Par contre, dans l'*immuno-stimulation anti-endotoxique et antibactérienne*, le Labrafil présente un pouvoir adjuvant remarquable. Cette propriété est due à une meilleure solubilisation des immunogènes et à une stimulation réticulo-endothéliale. Elle résulte aussi de la non séquestration des antigènes dans une lésion nodulaire.

Cet excipient offre l'avantage d'une *meilleure conservation* des immunogènes. Par contre, les immunogènes toxiques y sont plus actifs et provoquent des accidents tant toxiques qu'allergiques, soit à la vaccination, soit à la revaccination, soit à l'épreuve.

4° La comparaison de l'efficacité des deux vaccins antibrucelliques inactivés inclus dans des excipients différents montre que le pouvoir adjuvant de l'huile interestérifiée W.L. est plus important que celui de la Mayoline. Pour le vaccin antibrucellique comme pour tous les vaccins inactivés en général, l'inactivation entraîne une perte de l'effet choquant du virus vaccin. Un choc contrôlable est provoqué par le choix judicieux de l'adjuvant.

Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire,
R. FLORIO.

Vu : Le Responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire,
L. JOUBERT.

Le Doyen,
J.-F. CIER.

Le Président de Thèse,
MONNET.

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 5 Avril 1965.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université :
P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

1. Antigénicité. — Editions Médicales, Flammarion, Paris, 1963.
2. AXELROD (H.-E.) et PRUZANSKY (J.). — The role of the vitamins in antibody production ; vitamins and hormones, 1955, 13, 1.
3. BARR (H.). — The effects of other antigens on the responses of animals to diphtheria and tetanus toxoid. *Proc. Int. Symp. Immun.*, 1959, 271-277.
4. BANEY (R.-N.), VASQUEZ (J.-J.) et DIXON (F.-J.). — Cellular proliferation in relation to antibody synthesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 109, 1.
5. BASSET (J.). — Artifices employés dans l'immunisation (réaction locale, adsorbants, voie d'introduction). *Rev. Méd. Vét.*, 1950, 1.019, 337-353.
6. BILLINGHAM (R.-E.), BENT (L.) et MEDAWAR (P.-B.). — Extraction of antigens causing transplantation immunity. *Transpl. Bull.*, 1958, 5, 377.
7. BIOZZI (G.), HALPERN (B.-N.), BENACERAFF (B.), STIFFEL (C.) et MOUTON (D.). — Action de certains polymères macromoléculaires et notamment du dextran et de la polyvénylpyrrolidone sur la fonction phagocytaire du système réticulo-endothélial. *C.R. Soc. Biol.*, 1956, 150, 317.
8. BORDET (J.). — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Masson, 2^e éd., Paris, 1939.
9. BOYDEN (S.-V.). — The absorption of proteine on erythrocytis treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera. *Y. Exp. Med.*, 1951, 93, 107.

10. BOST (J.) et FARGEAS (J.). — Action directe du benzoate d'œstradiol sur le récepteur vaginal. Influence de la nature du solvant. *C.R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 1424.
11. BRAUN (W.). — Biological interactions in normal and neoplastic growth : a contribution to the posttumor problem ; Henry Ford Hospital International Symposium, Bennan (M.-J.) et Simpson (W.-L.), Churchill, London, 1962.
12. BURNET (F.-M.). — Role of the thymus and related organs in immunity. *Brit. Med. J.*, 1962, **2**, 807.
13. BUSSARD (A.). — *J. Physiol.*, 1952, **44**, 717.
14. BUTLER (N.-R.), WILSON (R.-D.-R.), BENSON (P.-F.), DUNGEON (J.-A.), UNGAR (U.) et BEALE (A.-J.). — Action du phosphate d'aluminium sur la formation des anticorps après administration du vaccin antipoliomyélitique. *Lancet*, 1962, **5**, 114-115.
15. CARRAZ (M.). — Communication personnelle.
16. COONS (A.-H.), LEDUC (E.-H.) et COUNOLLY (J.-M.). — *J. Exp. Med.*, 1955, **102**, 49-61.
17. COTTE (J.). — Problème de l'excipient pour pommades. *Lyon Pharm.*, juin 1955.
18. DIXON (F.-J.) et MAURER (P.-H.). — Immunologie unresponsiveness induced by protein antigen. *Y. Exp. Med.*, 1955, **101**, 205.
19. DRESSER (D.-W.). — Acquired immunological tolerance to a fraction of bovine gammaglobulin. *Immunology* 1961, **4**, 13.
20. DRIEUX (H.) et THIERY (G.). — Placentation chez les mammifères domestiques. *Rec. Méd. Vét.*, Alfort, 1949, **140**, 125.
21. EAGLE (R.-L.) et WOODS (K.-R.). — Comparative biochemistry and embryology in plasma proteins. Vol. 2 (Putman F.-W. ed., Academic Press, New-York, 1960), chapitre 15, p. 183.
22. EISEN (H.-N.), SCHAFFER (J.-H.), LOGRIFFO (G.-A.) et CHASE (M.-W.). — Mechanisms of hypersensibility. Little Brown and Co, Boston, 1959, p. 413.
23. FARTHING (J.-R.), HOLT (L.-B.). — Experiments designed to determine the mechanism of the adjuvant activity of gram negative organisms upon antibody production. *J. Hyg.*, 1962, **60**, 411-426.

24. FELTON (L.-D.). — The significance of antigen in animal tissue. *J. Immun.*, 1949, 61, 107.
25. FINGER (H.). — Etude expérimentale du mode d'action de l'adjuvant de Freund. *Arch. Hyg. Berl.*, 1962, 146, 61-69.
26. FINGER (H.). — Tentative de démonstration du mode d'action de l'adjuvant de Freund. *Z. Immun., Forsch.*, 1961, 122, 15-34.
27. FREUND (J.), CASALS (J.) et HOSNIER (E.-P.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1937, 37, 509.
28. FREUND (J.). — Some aspects of active immunization. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1947, 1, 291.
29. FRIEDMAN (H.). — *J. Immunol.*, 1964, 92, 201-207.
30. GLENNY (A.-T.). — Active immunization with toxin, in a system of bacteriology, 1931, vol. 6, ch. 4 (London).
31. GRABAR (P.) et MIESCHER (P.-H.). — Mechanism of cell and tissue damage produced by immune action. II. International Symposium in Immunopathology, 1961, Beuno Schwabe C. (Basel, Stuttgart).
32. GRAFE (A.) et KUHN (R.-B.). — L'augmentation du pouvoir antigénique des vaccins par adsorption sur hydroxyde d'aluminium. *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)*, 1962, 12, 392-395.
33. HAAS (R.) et THOMSEN (R.). — Les adjuvants en immunologie. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1961, 86, 1.462-1.486.
34. HARRISSON (W.-I.). — Some observation on the use of alun precepited diphteria toxoide. *Amer. J. Publ. Haelth*, 1963, 25, 298.
35. HEIDELBERGER (M.), MAC LEOD (C.-M.) et DILOPIS (M.-M.). — *J. Exp. Med.*, 1948, 88, 369.
36. HIRATA (A.-A.) et REDLICH (M.). — Effects of Colchicine on antibody response in hamsters. *Proc. Sc. Exper. Biol.*, 1962, 109, 628-630.
37. ISCAKIS (S.) et RAYNAUD (M.). — Propriétés de fragments de molécules d'anticorps antitoxiques (antidiphtériques) obtenus par digestion pepsique du précipité spécifique et réduction *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 253, 2.286.
38. JACOTOT (H.). — Le latex d'Hévéa brasiliensis en tant qu'adjuvant de divers vaccins. *C. R. Acad. Sc.*, 1947, 224, 1.390.

39. JACOTOT (H.). — Du rôle et du mode d'action des substances adjuvantes en immunologie. *Cah. Méd. Vét.*, 1962, 1, 67.
40. JACOTOT (H.), GUILHON (J.-C.), VIRAT (B.) et VALLÉE (A.). — A propos des accidents consécutifs à la vaccination antirabique ; l'exaltation du pouvoir allergisant par les substances adjuvantes. *Rev. Franç. Allergie*, 1962, 2, 127.
41. JONQUIERS (H.), CUILLERET (P.), MAHLER (E.) et GATTEFOSSÉ (M.-H.). — Recherches sur la physico-chimie de la peau. Janody, éd., Lyon, 1941.
42. JOUBERT (L.). — *Rev. Méd. Vét.*, 1959, 110, 41.
43. JOUBERT (L.), FLORIO (R.), COTTEREAU (Ph.), OUDAR (J.) et VALENTIN (L.). — Accidents allergiques chez le poulain, le veau et le porcelet dus aux autovaccins d'exploitation. *Rev. Méd. Vét.*, 1958, 110, 445-451.
44. JOUBERT (L.) et CHAMBON (M^{me} J.). — Stabilité et validité des antibiotiques majeurs dans un excipient huileux hydrophile, huile de noyau interestérifié. *Ann. Pharm. Fr.*, 1960, 18, 545.
45. KARUSH. — *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1958, 20, 581.
46. LAWRENCE (H.-S.). — Cellular and humoral aspects of immunity. Ciba Foundation Symposium, 1 vol., Churchill, London, 1960.
47. LEMETAYER (E.). — Mécanisme de l'action des adjuvants de l'immunité ; antigène retard. *Bull. Acad. Vét. France*, 1950, 40, 59.
48. LÉPINE (P.). — Immunité provoquée et vaccination dans les maladies à virus. Cours d'immunologie générale et sérologie, Cours I.P., 1964, p. 1.052.
49. LEVADITI (J.-C.) et CHADLI (A.). — Substances adjuvantes de l'immunité : étude du rôle des réactions inflammatoires locales. *Tunis Méd.*, 1961, 67, 227-733.
50. LIACOPOULOS (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1961, 253, 751.
51. LOISELEUR (J.) et PETIT (M.). — Action des Rayons X sur la formation des anticorps consécutive à une injection unique d'antigène. *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, 103, 54.
52. MEDAWAR (P.-B.). — The immunology of transplantation. *The Harvey Lectures, Acad. Press, New-York*, 1958, 144-176.

53. MICHAELIS (L.). — *Dent. Z. Med. Wschr.*, 1904, 253, 751.
54. MILLER (J.-F.-A.-P.). — Origines of immunological competence. *Brit. Med. J.*, 1963, 19, 214.
55. MILLER (J.-F.-A.-P.), MARSHALL (A.-H.-E.) et WHITE (R.-G.). — The immunological significance of the thymus ; advances in the immunology. 1962, 2, 111.
56. MODERN (F.). — Vaccins antitétanique et antidiphtérique combinés à la protamine et d'autres adjuvants. *C. R. Soc. Biol.*, 1960, 154, 829-830.
57. MORRONE (G.), NUNZIATA (B.) et PICCIOTO (L.). — Riposta immunitaria del lattante vaccinato con quadruplo vaccino D.P.T.-polio. *Riv. Ist. Sieroter Ital.*, 1959, 34, 321-329.
58. NICOL (L.). — De l'emploi des substances dites « adjuvantes et stimulantes » dans l'immunisation active. *Bull. Acad. Vét. France*, 1950, 17, 47-68.
59. OWEN (R.-D.). — Immunogenic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science*, 1945, 102, 400.
60. PAPPENHEIMER (B.-W.), CONDIC (R.-M.) et GOOD (R.-A.). — Evolution of the immune response. In the philogenetic development of adaptative immunologic responsiveness invertebrates. *J. Exp. Med.*, 1964, 119, 105.
61. PARAF (A.), FONGEREAU (M.) et METZGER (J.-J.). — Rôle de l'adjuvant de Freund dans l'induction de la tolérance immunitaire à l'albumine humaine. Colloque Int. Rayaumont, Paris, Ed. du C.N.R.S., 1962.
62. PARAF (A.), FONGEREAU (M.) et METZGER (J.-J.). — Etude sur la réactivation immunologique spontanée. *C. R. Acad. Sc.*, 1963, 257, 312.
63. PARAF (A.) et MORAILLON (A.). — Mécanisme de la synthèse des anticorps, phase de préparation non spécifique des cellules devenant compétentes. *C. R. Acad. Sc.* (sous presse), 1964.
64. PEREZ (J.-J.) et PAUTRIZEL (R.). — Sur l'immunotolérance du lapins : effets d'un adjuvant minéral. *C. R. Acad. Sc.*, 1962, 254, 4.536-4.538.
65. PERNIS (B.) et PARONETTO (F.). — L'action adjuvante de la silice (tridymite) sur la production des anticorps. *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1962, 110, 390-392.
66. PONTECORVO (M.). — Quelques données expérimentales sur le renforcement du pouvoir de genèse des anticorps des vaccins. *Riv. Ist. Sieroterap. Ital.*, 1962, 37, 49.

67. POPOVICI (I.) et GOGOASA (V.). — Recherches sur le mécanisme de l'action adjuvante immunogène de l'hydroxyde d'aluminium, le rôle de foyer inflammatoire. *Ann. Inst. Path. Sl. Igiena Animala*, 1955, 5, 150.
68. PRÉVOT (A.-R.). — *Clostridium Botulinum*. Cours I. P., 1963-1964, 499.
69. PRÉVOT (A.-R.), HALPERN (B.), BROZZI (G.), Mlles STIFFEL (G.), MOUTON (D.), MORARD, Mlle BOUTHILLIER (J.) et DECREUSEFOND. — Stimulation du système réticulo-endothélial par les corps microbiens liés en *Corynebacterium parvum*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1963.
70. RAMON (G.). — Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphthérique. *Bull. Soc. Centr. Méd. Vét.*, 1925, 101, 227.
71. RAMON (G.). — Procédés pour accroître la production des anatoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1927, 41, 803.
72. RAMON (G.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1935, 96, 201.
73. RAMON (G.). — Au sujet des substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité. *Bull. Acad. Vét. France*, 1949, 112, 253-346.
74. RETHY (L.), RAUSS (K.), DETYL (I.) et MOROCZI (J.). — Recherches sur l'effet immunisant des antigènes tétaniques et dysentériques combinés à « l'action de rappel ». *Ann. Immunol. Hung.*, 1959, 2, 43-54.
75. RICHOU (R.), JENSEN (R.) et BELIN (Cl.). — Propriétés hémolytiques de la saponine et pouvoir adjuvant vis-à-vis de l'immunité anti-staphylococcique. *C. R. Acad. Sc.*, 1963, 257, 2.571-2.572.
76. RIMLINGER (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1920, 82, 1.098.
77. ROUX (E.) et YERSIN (A.). — Contribution à l'étude de la diphtérie. *Ann. Inst. Pasteur*, 1889, 3, 275.
78. SALK (J.-E.). — Use of adjuvants in studies on influenza immunization. 3 degrees of persistence of antibody in human subjects two years after vaccination. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1953, 151, 1.169.
79. SCHMIDT (S.). — Die Bedeutung der Adsorption für die aktive Immunisierung gegen Viruskrankheiten. *Archiv. für die (gesamte) Virusforschung*, 1939, 1, 215.
80. SEDAILLAN (P.), BERGER (M.) et CARRAZ (M.). — Persistance des antitoxines chez les animaux anciennement immunisés et soumis à des soustractions sanguines répétées. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 357.

81. SEGRE (D.). — Antibody formation in baby pigs. Colloques Intern. C.N.R.S. (Tolérance Immunol.), 1963, n° 116, 417-428.
82. SERCAZ (E.) et COONS (A.-H.). — Specific inhibition of antibody formation during immunological paralysis and unresponsiveness *Nature*, 1959, 184, Suppl., p. 1.086.
83. SERCAZ (E.) et COONS (A.-H.). — The absence of antibody production during unresponsiveness to B.S.A. in the mouse. *J. Immunol.*, 1963, 90, 478.
84. STAVITSKY (A.-B.) et MATHIES (M.). — *Fed. Proc.*, 1962, 21, 26.
85. SURDAN (C.), DIMITRIU-CAROL (E.), CURE (C.) et AGELSIN (N.). — Studi si cercetara in Frans, 1960, 11, 273.
86. TALIAFERRO (W.-H.). — Synthesis and degradation of antibody-*J. Cell. and Comp. Physiol.*, 1957, 50, Suppl. 1.
87. THIBAUT (P.). — *Brucella*, Cours I.P., 1964, p. 196.
88. TURPIN (A.). — Plectridium Tetani. Cours I.P., 1964, 523.
89. VALETTE (Cl.). — Etude d'un nouvel excipient huileux hydrophile. *Thèse Doct. Vét.*, Lyon, 1957.
90. VALLÉE (H.). — *Bull. Acad. Méd.*, 1938, 119, 116.
91. VESSEY (S.-H.). — Effects of grouping on levels of circulating antibodies in mice. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1964, 115, 252-255.
92. WESTPHAL (O.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, 98, 7.789.
93. ZAKAROVA (M.-S.) et DADESHAN (M.-A.). — Reactogenicity of associated vaccines. *Vest. Akad. Med. Naouk*, 1960, 10, 35-39.
94. ZDRODOWSKI (M.-P.) et GOURWITCH (H.-K.). — Sur les mécanismes physiologiques de la production des anticorps. *Rev. Immun.*, 1961, 25, 23.

APPENDICE

95. BARRIE (J.-U.), COOPER (G.-N.). — Enhancement of the primary antibody response to particulate antigens by simple lipids. *J. Immunol.*, 1964, 92, 529-539.
96. BONET-MAURY (P.), JUDE (A.) et SERVANT (P.). — *Revue Immunol.*, 1954, 18, 21.
97. MAC DIARMID (A.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, 102, 792.
98. MAC EWEN (A.-D.), SAMUEL (J.). — *Vet. Rec.*, 1955, 67, 546.
99. RENOUX (G.). — *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 1958, 35, 251.
100. WILNER (B.-I.), EVERS (M.-A.), TROUTMAN (H.-D.), TRADER (F.-W.), MC LEAN (I.-W.). — *J. Immunol.*, 1963, 91, 210-229.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION	13
PREMIERE PARTIE. — Etude synthétique des substances adjuvantes et stimulantes de l'Immunité	17
Généralités : I. Définition - II. Synonymie - III. Importance - IV. Historique	19
Inventaire et Classification	27
CHAPITRE I. — Rappels sur la réponse immunitaire	31
CHAPITRE II. — Moyens d'étude	39
CHAPITRE III. — Etude qualitative de la stimulation de la réaction immunitaire	45
CHAPITRE IV. — Mécanisme d'action	53
CHAPITRE V. — Applications	59
DEUXIEME PARTIE. — Etude succincte de l'activité adju- vante et stimulante de l'immunité d'un excipient huileux hydrophile interestérifié	67
Généralités : I. Définition - II. Préparation - III. Propriétés physiochimiques	69
CHAPITRE I. — Toxicologie	71
CHAPITRE II. — Etude de quelques propriétés phar- macodynamiques du Labrafil	75
CHAPITRE III. — Effet phlogogène	79
CHAPITRE IV. — Pouvoir adjuvant et stimulant de l'immunité du Labrafil	85
I. — Séro-stimulation antitissulaire	89
II. — Séro-stimulation antibactérienne	89
III. — Immunostimulation anti-endotoxique et antibactérienne	98
CHAPITRE V. — Comparaison de trois excipients dont une huile interestérifiée sur la protection pro- curée par deux vaccins antibrucelliques inactivés	105
CONCLUSIONS	111
BIBLIOGRAPHIE	113

